

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Síntese e Caracterização de Membranas de
Quitosana-Colágeno Carregada com Nanopartículas de
Prata para Aplicação como Biomaterial**

Jonacir Novaes das Virgens

Dissertação de Mestrado em Química

**Vitória
2017**

Jonacir Novaes das Virgens

**Síntese e Caracterização de Membranas de
Quitosana-Colágeno Carregada com Nanopartículas de
Prata para Aplicação como Biomaterial**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Química do Centro de
Ciências Exatas da Universidade Federal
do Espírito Santo como requisito parcial
para obtenção do Título de Mestre em
Química

Área de Concentração: Química

Linha de Pesquisa: Físico-Química de
Soluções e Polímeros.

Orientador: Prof. Dr. Eloi A. da Silva Filho

**VITÓRIA
2017**

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Virgens, Jonacir Novaes das, 1980-
V816s Síntese e caracterização de membranas de quitosana-
colágeno carregadas com nanopartículas de prata para aplicação
como biomaterial / Jonacir Novaes das Virgens. – 2017.
74 f. : il.

Orientador: Eloi Alves da Silva Filho.
Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal
do Espírito Santo, Centro de Ciências Exatas.

1. Materiais biomédicos. 2. Quitosana. 3. Colágeno. 4.
Membranas (Tecnologia). 5. Nanopartículas. I. Silva Filho, Eloi
Alves da. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de
Ciências Exatas. III. Título.

CDU: 54

Síntese e Caracterização de Membranas de Quitosana-Colágeno Carregada com Nanopartículas de Prata para Aplicação como Biomaterial.

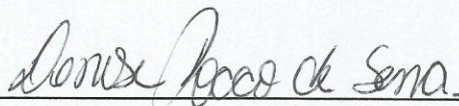
Jonacir Novaes das Virgens

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Química.

Aprovado em 05/04/2017 por:



Prof. Dr. Eloi Alves da Silva Filho
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador



Profa. Dra. Denise Rocco Sena
Instituto Federal do Espírito Santo
Examinador Externo



Profa. Dra. Rosângela Cristina Barthus
Universidade Federal do Espírito Santo
Examinador Interno

Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, abril de 2017

Aos meus pais José (in memorian) e Jaci.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, sem ele nada é possível.

A minha amada companheira, Aline Alvarenga, pela compreensão nesses muitos momentos de ausências.

A minha mãe pela vida, pelo incentivo e pela confiança a mim depositada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Eloi Alves da Silva Filho, pelas muitas horas de dedicação, incentivo e credibilidade.

Aos meus amigos do laboratório de Físico-Química pelo apoio e parceria.

Ao meu amigo e irmão Paulo Matheus pelo apoio, parceria e discussões fundamentadas na Química, que por muitos dias ultrapassamos a madrugada concatenando ideias.

Ao programa de pós-graduação em Química da UFES pelo enriquecimento científico a mim concedido.

A banca examinadora da dissertação de mestrado pela participação e contribuição neste trabalho.

Ao laboratório LPT pelo apoio na realização das análises, em especial à Vanessa pela dedicação.

Ao laboratório LUCCAR pelo apoio na realização das análises de MET.

Ao LabPetro pelo suporte técnico.

Enfim a todos que de forma direta e indiretamente contribuíram nessa caminhada.

*Se algum de vocês tem falta de sabedoria, peça-a a Deus, que a todos dá
livremente, de boa vontade; e lhe será concedida.*

Tiago 1:5

LISTA DE FIGURA

Figura 1: Tratamento de ferimentos na antiguidade[28].	23
Figura 2: Representação esquemática da epiderme (adaptado de Isaac C.; <i>et al.</i> 2010) [32]	26
Figura 3 : Esquema do processo de cicatrização do tecido epitelial	27
Figura 4 : Representação da estrutura molecular da Quitina (adaptado de Andrade, 2007)[36]	29
Figura 5: Representação da estrutura molecular da Quitosana (adaptado de Andrade, 2007)[36].	30
Figura 6: Representação esquemática que mostra as etapas intracelulares da síntese do colágeno e a fibrilogênese do colágeno que ocorre no espaço extracelular [1].	34
Figura 7: Representação esquemática do tropocolágeno [1].	35
Figura 8: Desenho esquemático mostrando como as moléculas de colágeno (tropocolágeno) se agregam para formar fibrilas, fibras e feixes [1].	36
Figura 9: Estrutura geométrica do HCl [67]	39
Figura 10: Deformações axiais e angulares de ligações em moléculas orgânicas [67]	40
Figura 11: Diagrama mostrando os principais componentes de um espectrômetro FTIR [68].	42
Figura 12: Difração de raios X[70].	43
Figura 13: Ilustração esquemática do MEV (adaptada) [72].	44
Figura 14: Desenho esquemático de um microscópio eletrônico de transmissão [1]	46
Figura 15: Etapa de purificação e síntese das AgCl _{NP} , (a) agitação; (b) filtração e (c) material da patente PI11064145 e (d) precipitado obtido na síntese das AgCl _{NP} as setas indicam a coloração desse precipitado.	49
Figura 16: Espectros de infravermelho da quitosana purificada	52
Figura 17: Padrão de difração de raios X da quitosana	53
Figura 18: Micrografias obtidas por MEV da quitosana com ampliação de 240x , escala 50 µm	54
Figura 19: Espectros de EDX da (região A) da quitosana	54
Figura 20: Micrografias obtidas por MEV da quitosana com ampliação de 80x, escala 200 µm.	55

Figura 21: Espectros de EDX da (região B) da quitosana.	55
Figura 22: Espectros de infravermelho: (a) quitosana; (b) quitosana-nanopartículas de cloreto de prata.	56
Figura 23: Padrão de difração de raios X da nanopartículas de cloreto de prata sintetizadas agregadas a matriz polimérica da quitosana	57
Figura 24: Espectros de EDX do precipitado da síntese das nanopartículas de cloreto de prata - quitosana.	58
Figura 25: Micrografia de MET das nanopartículas aderidas a quitosana: (a) escala de 20 nm, (b) escala de 20 nm, (c) escala de 30 nm e (d) histograma do tamanho médio das nanopartículas de cloreto de prata estimada pelo software imageJ.....	59
Figura 26: Espectros de infravermelho da quitosana, quitosana - colágeno (1:1) e colágeno.....	61
Figura 27: Espectros de infravermelho das membranas quitosana - colágeno: (a)1:1; (b) 1:2; (c) 1:3 e (d) 3:1	62
Figura 28: Imagens das membranas: (a) colágeno; (b) quitosana - colágeno (1:1) ; (c) quitosana - colágeno (1:2) ; (d) quitosana - colágeno (3:1) ; (e) quitosana - colágeno (1:3) e (f) vista lateral da membrana de quitosana - colágeno (1:1).....	63
Figura 29: Micrografias de MEV da membranas (1:1) : (a) quitosana - colágeno 50x; (b) quitosana - colágeno 400x; (c) visão lateral quitosana - colágeno 120x; e (d) visão lateral quitosana - colágeno 270x.	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estrutura química dos meros constituintes de polímeros comumente usados na produção de biomateriais e exemplos de suas aplicações típicas (Adaptado de Pires, <i>et al.</i> , 2015 [21])	22
Tabela 2: Lista dos materiais de curativos de feridas poliméricos atualmente disponíveis nos mercados mundiais.....	25
Tabela 3: Aplicações da quitina e quitosana em diferentes setores (adaptado de A. Rafique <i>et al.</i> , 2016)[45].	31
Tabela 4: Principais aplicações da quitina e quitosana em domínios farmacêuticos e biomédicos (adaptado de A. Rafique <i>et al.</i> , 2016) [45].....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UFES: Universidade Federal do Espírito Santo

QUI: Quitosana

COL: Colágeno

AgCl_{NP}: Nanopartículas de cloreto de prata

NP: Nanopartículas

Colabs. : Colaboradores

pH : potencial hidrogeniônico

LPT: Laboratório de Plasma Térmico

NCQP : Núcleo de Competências em Química do Petróleo

LabPetro: O Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Metodologias para Caracterização de Óleos Pesados

ASTM : *American Society for Testing and Materials*

FTIR : Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

DRX : Difração de raios X

EDX : Energia dispersiva de raios X

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão

RUFF : *Database of Raman Spectroscopy , X -ray diffraction and chemistry of minerals*

LISTA DE SÍMBOLOS

L : Litro
mL : mililitro
nm: nanômetro
g : grama
mg : miligrama
Da: Dalton
 α : alfa
% : porcentagem
Z: Número atômico
PA : para análise
m/v : relação massa por volume
mol/L : quantidade de matéria por litro
milimol : milésima parte de um mol
rpm : rotação por minuto
h : horas

min : minutos
 μm : micrômetro
m/v : massa /volume
v/v : volume/ volume
C : carbono
O: oxigênio
AgNO₃ : nitrato de prata
AgCl : cloreto de prata
Na : sódio
Ca : cálcio
P: fósforo
Ag : prata
H : hidrogênio
°C : graus Celsius
SH : tiol
kV : quilo-volt

RESUMO

Os denominados biopolímeros, destaque para a quitosana (QUI) e o colágeno (COL), vêm desempenhando um papel importante como biomateriais, esse novo campo de pesquisa na última década tem alcançado avanços notáveis nas áreas de substituição, reconstituição e regeneração tecidual, pois os mesmos apresentam características essenciais como biocompatibilidade, biodegradabilidade e não-citotoxicidade. Este trabalho consiste na obtenção e caracterização de membranas de quitosana/colágeno carregadas com nanopartículas de prata obtidas por mistura das soluções poliméricas em diferentes proporções em massa e posterior evaporação do solvente, já as nanopartículas de prata foram obtidas na própria matriz polimérica. As membranas quitosana/colágeno carregadas com nanopartículas de prata foram caracterizadas através das técnicas de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), raios X (DRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e espectroscopia de energia dispersiva (EDX). Os resultados obtidos demonstraram que o método de síntese das membranas por evaporação e a síntese das nanopartículas de prata na matriz polimérica foram realizados com muita eficiência e comprovados pelos resultados obtidos. As blendas de quitosana-colágeno obtidas e analisadas por MEV apresentaram uma morfologia formada por estruturas porosas e interconectadas. A proporção em massa de QUI/COL foi importante para a manutenção da estrutura do colágeno uma vez que na proporção 3:1 (m/m de QUI-COL) observou-se através do espectro vibracional uma diminuição da razão entre os picos de 1235 cm^{-1} e 1450 cm^{-1} respectivamente, o que sugere que o aumento da proporção de quitosana acarreta em uma perda da integridade proteica do colágeno. As nanopartículas de cloreto de prata agregadas a matriz polimérica da quitosana obtidas tinha tamanho médio de 25 nm confirmadas por MET, no difratograma de raios X foram observado picos padrões para nanopartícula de cloreto de prata, no EDX do precipitado obtido da síntese das nanopartículas de prata foi observado além dos elementos prata e cloro a presença dos elementos carbono e oxigênio que confirmam a presença da matriz da quitosana aderida às nanopartículas de cloreto de prata.

Palavras-Chave: biomaterial, quitosana, colágeno, membrana, nanopartículas, prata.

ABSTRACT

So-called biopolymers, especially chitosan (CHI) and collagen (COL), have been playing an important role as biomaterials, this new field of research in the last decade has achieved remarkable advances in the areas of tissue replacement, reconstitution and regeneration, since the Biocompatibility, biodegradability and non-cytotoxicity. This work consists of obtaining and characterizing chitosan / collagen membranes loaded with silver nanoparticles obtained by mixing the polymer solutions in different mass proportions and subsequent evaporation of the solvent, since the silver nanoparticles were obtained in the polymer matrix itself. The chitosan / collagen membranes loaded with silver nanoparticles were characterized by Fourier transform infrared (FTIR), X-ray (XRD), scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM) and energy spectroscopy Dispersive (EDX). The results obtained demonstrated that the method of synthesis of the membranes by evaporation and the synthesis of the silver nanoparticles in the polymer matrix were performed very efficiently and proved by the results obtained. The chitosan-collagen blends were analyzed and analyzed by SEM, with a morphology composed of porous and interconnected structures. The mass ratio of QUI / COL was important for the maintenance of the collagen structure since in the ratio 3:1 (m / m of QUI-COL) a decrease in the ratio between the peaks of 1235 cm^{-1} and 1450 cm^{-1} , respectively, suggesting that increasing the chitosan ratio leads to a loss of collagen protein integrity. The silver chloride nanoparticles added to the polymer matrix of the obtained chitosan had an average size of 25 nm confirmed by MET, in the X-ray diffractogram were observed standard peaks for silver chloride nanoparticle, in the EDX of the precipitate obtained from the synthesis of the silver nanoparticles It was observed besides the silver and chlorine elements the presence of carbon and oxygen elements that confirm the presence of the chitosan matrix adhered to the silver chloride nanoparticles.

Keywords: biomaterial, chitosan, collagen, membrane, nanoparticles, silver.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 BIOMATERIAL	20
2.2 ENGENHARIA TECIDUAL	21
2.3 UTILIZAÇÃO DE MEMBRANAS POLIMÉRICAS NO PROCESSO DE REGENERAÇÃO DO TECIDO EPITELIAL	23
2.4 PELE	26
2.5 QUITINA	28
2.6 QUITOSANA	30
2.7 COLÁGENO	34
2.8 NANOCIÊNCIA E NANOPARTÍCULAS	36
2.9 FERRAMENTAS DE ANÁLISE	39
2.9.1 Espectroscopia de Infravermelhos com transformadas de Fourier	39
2.9.2 Difração de raios X (DRX)	42
2.9.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	43
2.9.4 Energia dispersiva de raios X (EDX)	44
2.9.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	45
3 OBJETIVOS	47
3.1 OBJETIVO GERAL	47
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	48
4.1 METODOLOGIA	48
4.1.1 Purificação da quitosana	48
4.1.2 Síntese das Nanopartículas de prata	48
4.1.3 Síntese das membranas de quitosana-colágeno	49
4.1.4 Síntese das membranas de quitosana - colágeno carregadas com Nanopartículas de prata	50
4.1.5 Espectroscopia de Infravermelhos com transformadas de Fourier (FTIR) ...	50
4.1.6 Difração de raios X (DRX)	50
4.1.7 Energia dispersiva de raios X (EDX) e MEV	51
4.1.8 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	51
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA	52
5.2 CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA	56

5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA – COLÁGENO ...	60
6 CONCLUSÕES	66
7 TRABALHOS FUTUROS	67
8 REFERÊNCIAS	68

1 INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano e além de desempenhar um importante papel na homeostase do corpo humano, está também associada como barreira física contra a invasão de microrganismo [1]. A integridade desse órgão pode ser afetada por diversas causas com diferentes etiologias o que pode afetar sua integridade, o que levaria a perda de suas funções, logo, há necessidade de intervenções a fim de evitar danos mais complexos ao organismo.

Essa necessidade de restabelecer a homeostase e a integridade do organismo servem de motivação para pesquisas, dentro desta perspectiva surge um campo multidisciplinar da pesquisa denominado de engenharia tecidual e medicina regenerativa, que emprega princípios da química, ciências biológicas e da engenharia para o crescimento, o desenvolvimento e regeneração dos tecidos e órgãos danificados [2].

Os denominados biopolímeros vêm desempenhando um papel importante nessa área [3], muitos avanços notáveis na tecnologia tecidual têm seguido a exploração das propriedades oferecidas pelos novos materiais poliméricos, por suas misturas ou por seus compósitos. Esses biomateriais por apresentarem biocompatibilidade com tecidos e órgãos, biodegradabilidade, propriedades mecânicas adequadas e boa porosidade, já que os poros são importante pois proporcionam espaço para que ocorra crescimento celular e favorece o transporte de nutrientes, metabólitos e de moléculas mensageiras para o crescimento e desenvolvimento tecidual [3,4,5].

Muitos biopolímeros são utilizados em conjunto para potencializar as propriedades químicas e físicas [6,7,8], essa mistura miscível de dois biopolímeros com diferentes características físico-químicas podem levar ao desenvolvimento de um novo biomaterial com propriedades únicas que podem acentuar as vantagens de cada polímero e compensar suas desvantagens individuais [9].

Entre os diferentes polímeros utilizados na engenharia tecidual a quitosana, um polímero obtido da quitina, tem tido seu destaque por apresentar características

particularmente valiosas, que além da biocompatibilidade e biodegradabilidade anteriormente descrito como características dos biopolímeros, tem sido descrito na literatura a capacidade da quitosana de melhorar a cicatrização da injúria através da infiltração de células, proliferação de fibroplastos e deposição do colágeno em sua estrutura [10]. Um outro biopolímero, o colágeno, também tem se mostrado muito promissor nesse campo de pesquisa, vem sendo aplicada na fabricação de membranas bioativas, pois as mesmas servem como suporte para crescimento celular, além de veicular fármacos ou liberar outras substâncias com propriedades anti-inflamatória, antibacteriana e antioxidante no local da lesão [11,12,13].

Muitas combinações tem se mostrado promissoras Antunes *et al.* (2015) utilizando quitosana e arginina obteve membranas que apresentaram nanoestrutura altamente porosa, não citotóxica e com atividade bactericida, onde comprovou que, após estudos *in vivo*, estas membranas nano estruturadas facilitaram a proliferação e regeneração tecidual [14].

Em 2016 um estudo feito por Sionkowska, *et al.*, utilizando blendas de quitosana e colágeno com a adição de ácido hialurônico, um polissacarídeo glicosaminoglicano presente na matriz extracelular da pele, tecido conectivo e no humor vítreo, obtiveram resultados promissores uma vez que a adição de ácido hialurônico ao biomaterial formado por quitosana e colágeno aumentou a estabilidade térmica, elasticidade, facilitou a proliferação e serviu de base para regeneração tecidual, principalmente de tecidos cartilaginosa [15].

Um levantamento bibliográfico feito no *Scopus* foi verificado para o ano de 2015, um pouco mais de 30 publicações trataram da utilização de membranas formadas por colágeno e quitosana e que 40 %, dos trabalhos, relataram o emprego destas membranas na área médica e em 2016 somente 5 publicações retrataram a associação da quitosana, colágeno e nanopartículas de prata [16].

No mesmo levantamento bibliográfico, no ano de 2016 já são mais de 4 mil publicações relatando a utilização da quitosana, destes 17% a utilizaram para aplicações na medicina, já o colágeno, somente em 2016 já ultrapassou 12 mil publicações retratando o polímero, destes 64% na área da medicina, em se tratando

da combinação dos dois biopolímeros são apenas pouco mais de 200 publicações em 2016 (42% na medicina) o que comprova a necessidade de exploração dessa combinação, já que se trata de uma associação promissora e ainda não tão explorada.

Tendo como base as características individuais de cada polímero, a quitosana e o colágeno associados podem conferir um biomaterial não-citotóxico, não-alergênico, biodegradável e poroso, e por isso venha facilitar tanto a proliferação quanto o crescimento celular, no entanto, essa associação pode minimizar a característica antibacteriana da quitosana, daí a necessidade de inserir a prata com o objetivo de auxiliar nesse processo.

Durante séculos, a prata tem sido utilizada para o tratamento de queimaduras e feridas crônicas, em 1000 a.C. a prata já era utilizada para tornar a água potável e ao final do século XIX, era comum a prática de usar solução de nitrato de prata (1%) em curativos para reduzir infecções pós-operatórias oculares [17]. Atualmente, o avanço na nanotecnologia possibilitou a síntese e caracterização de uma série de nanoestruturas, e como as nanopartículas provaram, no decorrer dos anos, terem inúmeras aplicações, especialmente medicinais, pela ação dos íons e metais reduzidos contra bactérias e fungos patogênicos, graças à sua interação com células vivas. E dentre as nanopartículas as de prata têm fundamental importância, pois seu amplo espectro de atuação inclui bactérias gram-positivas e gram-negativas, fungos filamentosos, leveduras e vírus, além de possuir baixa toxicidade para as células humanas, ação anti-inflamatória [18] e ação cicatrizante, pois estudos feitos por HUANG, *et al.* (2007) relatou que a mesma acelerava o processo cicatrizante [19].

Logo, tendo em vista as características bactericidas e bacteriostáticas da prata, a mesma ao ser adicionada a mistura polimérica irá acentuar a ação antibacteriana, anti-inflamatória e cicatrizante.

O biomaterial, que por definição é qualquer tipo de material utilizado para fabricação de dispositivos para substituição de uma parte ou de uma função do corpo, de maneira aceitável fisiologicamente, ao ser incorporado com nanopartículas

de prata, através da mistura das soluções poliméricas com a dispersão das nanopartículas de prata, espera-se obter uma maior atividade bactericida, já que a quitosana desestabiliza a membrana bacteriana, facilitando assim a permeabilidade das nanopartículas de prata para o citosol das células bacterianas, facilitando assim um dos mecanismos propostos de ação bactericida das nanopartículas prata, no qual elas interagem com grupos tióis de muitas enzimas bacterianas e bases nitrogenadas contendo fósforo, inibindo assim a transdução e transcrição proteica bacteriana [20].

Espera-se com essa membrana formada pela associação da quitosana, colágeno e incorporado com nanopartículas de prata às características ideais para ser utilizado como curativo para regeneração tecidual da pele, pois a ele se confere todas as características necessárias para proliferação, crescimento e homeostase tecidual.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIOMATERIAL

Biomateriais são definidos como dispositivos que entram em contato com sistemas biológicos (incluindo fluidos biológicos), com aplicações diagnósticas, vacinais, cirúrgicas ou terapêuticas, podendo ser constituídos de compostos de origem sintética ou natural, assim como de materiais naturais quimicamente modificados, tanto na forma de sólidos quanto de géis, pastas ou mesmo líquidos, não sendo necessariamente fabricados, como válvulas cardíacas de porcos e retalhos de pele humana tratados para uso como implantes [21].

Os biomateriais poliméricos estão dentre os mais empregados no âmbito médico [22]. As principais vantagens dos biomateriais poliméricos em comparação com os materiais cerâmicos ou metálicos incluem a facilidade de fabricação para produzir formas variadas (partículas, filmes, fios, dentre outros), o processamento secundário, custo razoável e disponibilidade em encontrar materiais com propriedades mecânicas e físicas desejadas para aplicações específicas [23].

Diversos critérios devem ser considerados ao se selecionar um material polimérico, uma vez que cada polímero pode apresentar propriedades particulares que irão direcioná-lo para uma aplicação específica [24]. Neste sentido, as formas que as cadeias podem assumir, a disposição das unidades monoméricas, a presença ou não de átomos ou grupos funcionais particulares, a rigidez estrutural, a polaridade da cadeia e a massa molar do polímero resultam em subclasses de compostos que podem apresentar comportamentos distintos e com potencial de aplicação visando diferentes finalidades [22].

A análise da forma de degradação dos polímeros é também de grande importância no direcionamento de sua aplicação específica, devendo-se considerar não somente a cinética do processo (que define sua duração *in vivo*), mas também a alteração progressiva de sua funcionalidade, já que modificações ocorrem progressiva e irreversivelmente na estrutura e composição do biomaterial, além das

propriedades dos produtos gerados ao longo de sua decomposição que podem, eventualmente, ser citotóxicos.

2.2 ENGENHARIA TECIDUAL

A engenharia de tecidos compreende estudos de células para fisiologia e biologia do órgão, bem como a interação destas células com os biomateriais. É destinada a promover a regeneração da lesão pela restauração viável de um tecido ou órgão [25].

A definição da engenharia de tecidos é ampla tem uma abordagem ampla e pode incluir dispositivos que sejam acelulares ou celulares. No caso de dispositivos de engenharia de tecido acelular haverá crescimento do tecido existente através do implante, já nos dispositivos de engenharia de tecido celular existirá o fornecimento de novas células ao sítio de implante [26].

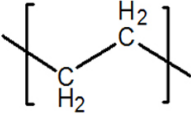
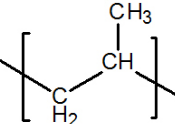
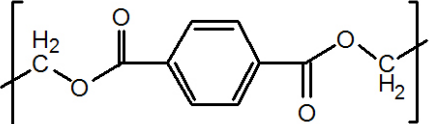
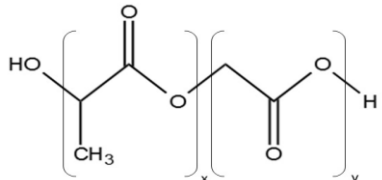
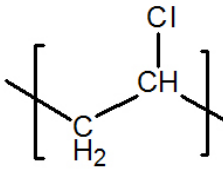
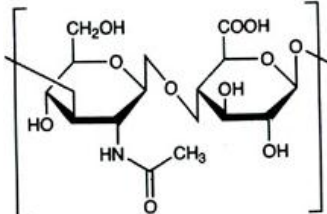
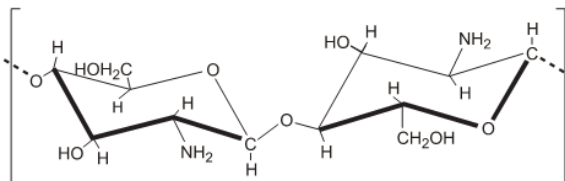
O sucesso de um biomaterial ou de um implante utilizado na engenharia tecidual depende de três fatores principais: as propriedades de biocompatibilidade do implante, o estado de saúde do paciente beneficiário e a competência durante sua aplicação [25].

Para classificar polímeros direcionados para engenharia de tecidos, duas propriedades são usadas tipicamente. Primeiro, o material é classificado por sua capacidade de fragmentação *in vivo*, isto, é, se o material é biodegradável ou não biodegradável [26]. A outra classificação utiliza-se como parâmetro o meio de obtenção do polímero, já que os mesmos podem ser obtidos a partir de reações de polimerização ou por meio de organismos vivos, classificando-se, assim, respectivamente, como sintéticos e naturais, os quais podem ser também quimicamente modificados [26].

Polímeros são macromoléculas de alta massa molar formadas pela ligação de unidades repetitivas menores (meros) ao longo da cadeia principal. As ligações entre os meros são covalentes, no entanto, ligações de hidrogênio entre diferentes cadeias, assim como interações de van der Waals e reticulação por meio de ligações

covalentes podem também ocorrer [23,25]. Na Tabela 1 encontra-se as estruturas monoméricas de alguns polímeros com suas respectivas aplicações na constituição de biomateriais.

Tabela 1: Estrutura química dos meros constituintes de polímeros comumente usados na produção de biomateriais e exemplos de suas aplicações típicas (Adaptado de Pires, *et al.*, 2015 [21])

POLÍMERO	ESTRUTURA	APLICAÇÃO
Polietileno (PE)		Tubos de drenagem e cateteres.
Polipropileno (PP)		Suturas e reparo de hérnias.
Poli(tereftalato de etileno) (PET)		Enxertos vasculares, reconstrução de ligamentos e fixação de implantes.
Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA)		Suturas e suporte para crescimento celular.
Poli(cloreto de vinila) (PVC)		Sacos para armazenamento de sangue.
Ácido hialurônico		Carreador de células, substituto de fluido sinovial.
Quitosana		Curativos, suporte para crescimento celular e dispositivo para liberação de drogas.

2.3 UTILIZAÇÃO DE MEMBRANAS POLIMÉRICAS NO PROCESSO DE REGENERAÇÃO DO TECIDO EPITELIAL

As tentativas humanas de intervir no processo de cicatrização das feridas, acidentais ou provocadas intencionalmente como parte da realização de procedimentos invasivos, remontam à antiguidade [27] (Figura 1), desde então já se reconhecia a necessidade de reestabelecer a integridade deste órgão. Durante anos, o homem usou diferentes materiais com esse intuito como exemplo o mel, gorduras animais e fibras vegetais, no entanto, desenvolvimentos contínuos levaram ao uso extensivo de novas bandagens e estas atualmente são geralmente formadas por polímeros.

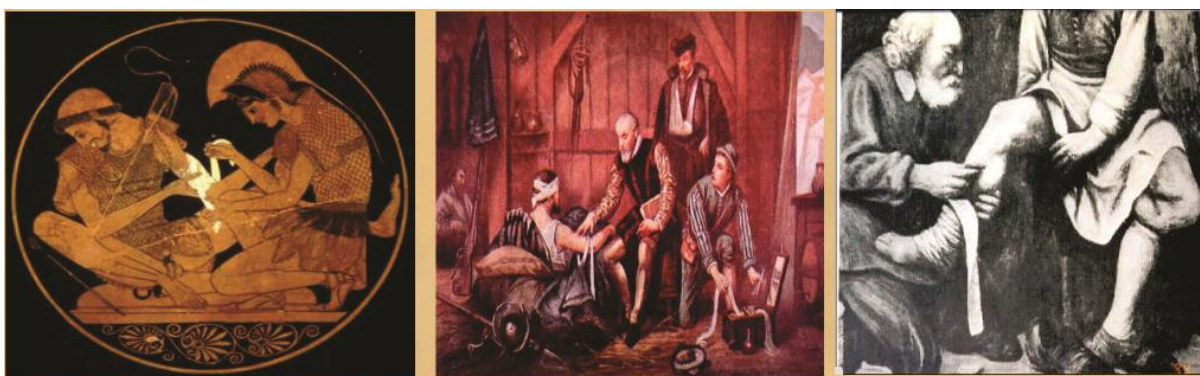


Figura 1: Tratamento de ferimentos na antiguidade[28].

Nos anos 60 já eram utilizados os curativos poliméricos, porém, eram considerados apenas materiais passivos que têm o papel mínimo no processo de cicatrização. George D. Winter [28] introduziu a primeira geração de polímeros curativos e forneceu os ambientes ótimos para reparação de feridas. Em meados da década de 1970, membranas poliméricas foram investigadas para desenvolvimento de materiais para curativos sintéticos e em 1978, vários materiais poliméricos à base de quitina foram utilizados como curativos de feridas, devido as suas atraentes atividades biológicas, mostrando que os polímeros são excelentes candidatos para o desenvolvimento de materiais para curativos [29].

Os curativos para feridas podem ser classificados utilizando diferentes aspectos, sendo a principal classificação a que utiliza como parâmetro a interação

do material da bandagem com o tecido. O primeiro tipo são os produtos passivos que são curativos comuns, como gaze que apenas atua como uma cobertura comum em uma ferida para que o tecido possa ser regenerado por baixo [30].

O segundo tipo de curativos para feridas são materiais interativos contendo filmes poliméricos e/ou espumas transparentes e permeáveis a vapor de água e oxigênio atmosférico, esses materiais, como ácido hialurônico e hidrogéis são boas barreiras contra permeação de bactérias do ambiente para a ferida. Os últimos tipos de curativos para feridas são materiais bioativos tais como hidrocolóides, alginatos, colágenos e quitosana [30].

O tratamento das feridas inclui métodos clínicos e cirúrgicos e o curativo é o tratamento clínico mais frequentemente utilizado para auxiliar a reparação tecidual [31]. A escolha do material adequado para o curativo decorre do conhecimento tanto fisiopatológico como bioquímico dos mecanismos de cicatrização e reparação tissular.

Traumatismos, queimaduras, úlceras por pressão, úlceras por hipertensão venosa, feridas em membros inferiores de indivíduos diabéticos e feridas por radioterapia são exemplos de algumas das etiologias de feridas encontradas no meio ambulatorial e hospitalar. Quanto à complexidade, define-se ferida simples como aquela que evolui espontaneamente para a resolução, seguindo os três estágios principais da cicatrização fisiológica: inflamação, proliferação celular e remodelagem tecidual [32]. Já lesões que acometem áreas extensas e/ou profundas, que necessitam de recursos especiais para sua resolução, têm seu processo de evolução natural alterado e representam ameaça à viabilidade de um membro ou feridas recorrentes que reabram ou necessitem de tratamento mais elaborado, são denominadas feridas complexas [33].

Na Tabela 2, encontra-se uma lista de curativos poliméricos e suas respectivas aplicações e uma breve descrição como podem ser sintetizados para que os mesmos possam ser utilizados no processo de auxílio na regeneração tecidual.

Tabela 2: Lista dos materiais de curativos de feridas poliméricos atualmente disponíveis nos mercados mundiais

TIPO DE CURATIVO	DESCRIÇÃO	PRINCIPAIS APLICAÇÕES
Filmes poliméricos	Os filmes são sintetizados a partir de poliuretano ou qualquer outro material polimérico.	Feridas superficiais
Espumas poliméricas	Espumas para revestimento de feridas são sintetizadas a partir de espumas hidrofílicas e suporte hidrofóbicos ou semi-permeáveis. (Polioxietileno glicol cercado com poliuretano ou silicone / poliéster)	Feridas crônicas e queimaduras
Hidrogéis poliméricos	Os hidrogéis são sintetizados a partir de um polímero hidrofílico reticulado (Álcool polivinílico , pirrolidona ou polietileno)	Feridas causadas por quimioterapia, feridas de espessura média e feridas de órgãos.
Alginatos	O ácido algínico (como também é chamado) é encontrado em alguns tipos de algas marrons e é similar à celulose. Os hidrogéis são obtidos através da reação com Ca, Mg e Zn.	Queimaduras, feridas cirúrgicas, úlceras crônicas e feridas com exudados elevados.
Hidrocolóides poliméricos	Os Hidrocolóides são curativos contendo agentes em formato gelatinoso, geralmente carboximetilcelulose sódica (NaCMC), pectina e gelatina.	Úlceras crônicas, queimaduras e feridas de espessura média

2.4 PELE

A pele recobre a superfície do corpo e apresenta-se constituída por uma porção epitelial de origem ectodérmica, a epiderme, e uma porção conjuntiva de origem mesodérmica, a derme (Figura 2). Ela é o maior órgão do corpo humano, correspondendo a aproximadamente 16% do peso corporal, suas principais células são na epiderme queratinócito e, na derme, é o fibroblasto [1].

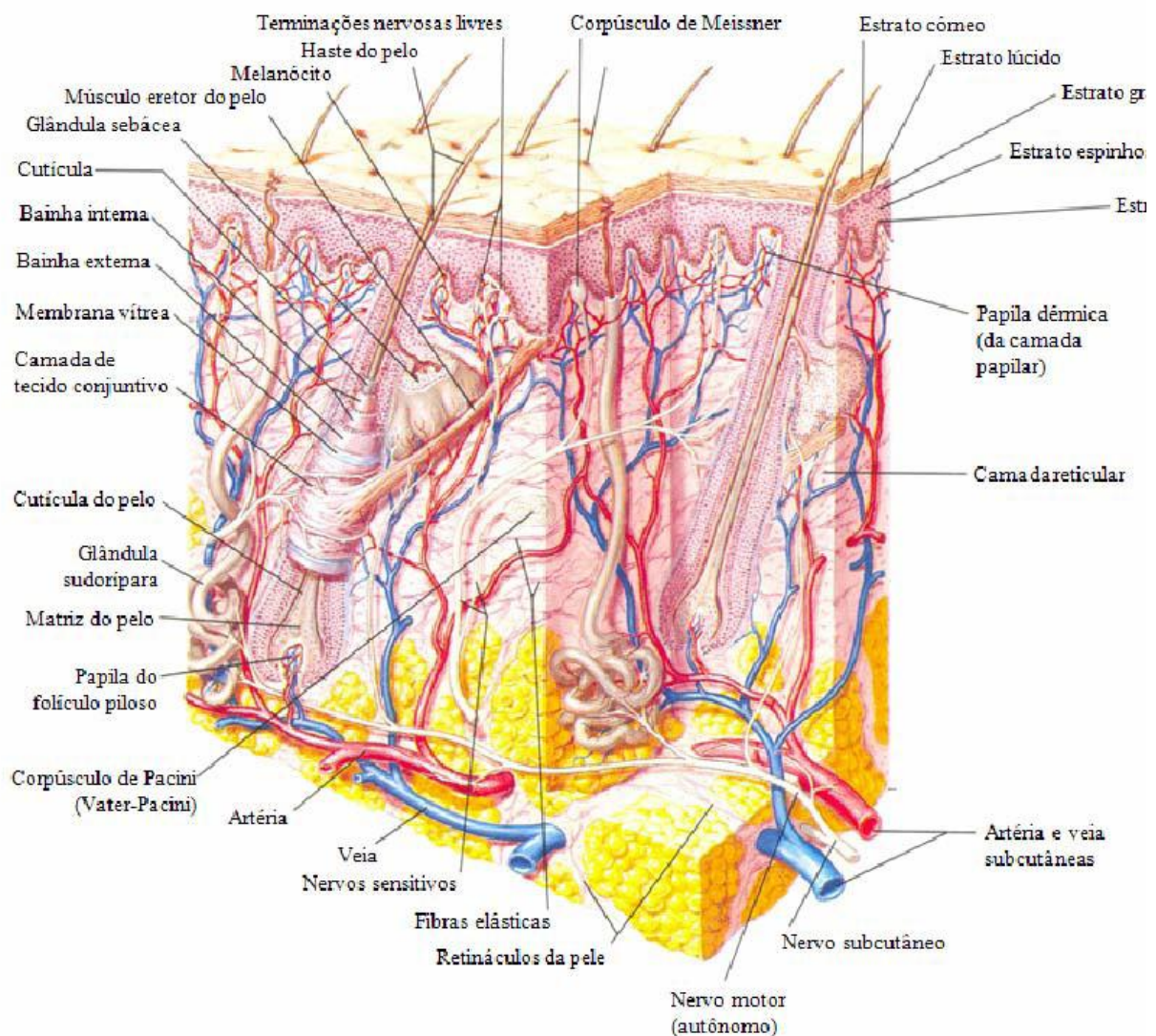


Figura 2: Representação esquemática da epiderme (adaptado de Isaac C.; *et al.* 2010) [32]

No entanto, este importante órgão está sujeito a diferentes tipos de estímulos danosos, os quais desencadeiam e/ou acionam vias biológicas na tentativa de

restabelecer a homeostasia desta estrutura. O conjunto dessas vias de reestabelecimento de funções recebe a denominação de cicatrização [32].

A cicatrização também depende de vários fatores, locais e gerais, como: localização anatômica, tipo da pele, raça, técnica cirúrgica utilizada dentre outros⁵. O mecanismo de cicatrização é um complexo processo biológico que envolve uma cascata perfeita e coordenada de células e eventos moleculares para a reconstituição de tecidos lesionados [34]. Este processo surge como resposta do tecido a lesões sendo caracterizado por três fases (Figura 3) que se sobrepõem e apresentam característica específicas: Fase inflamatória, fase proliferativa e fase de remodelação [32].

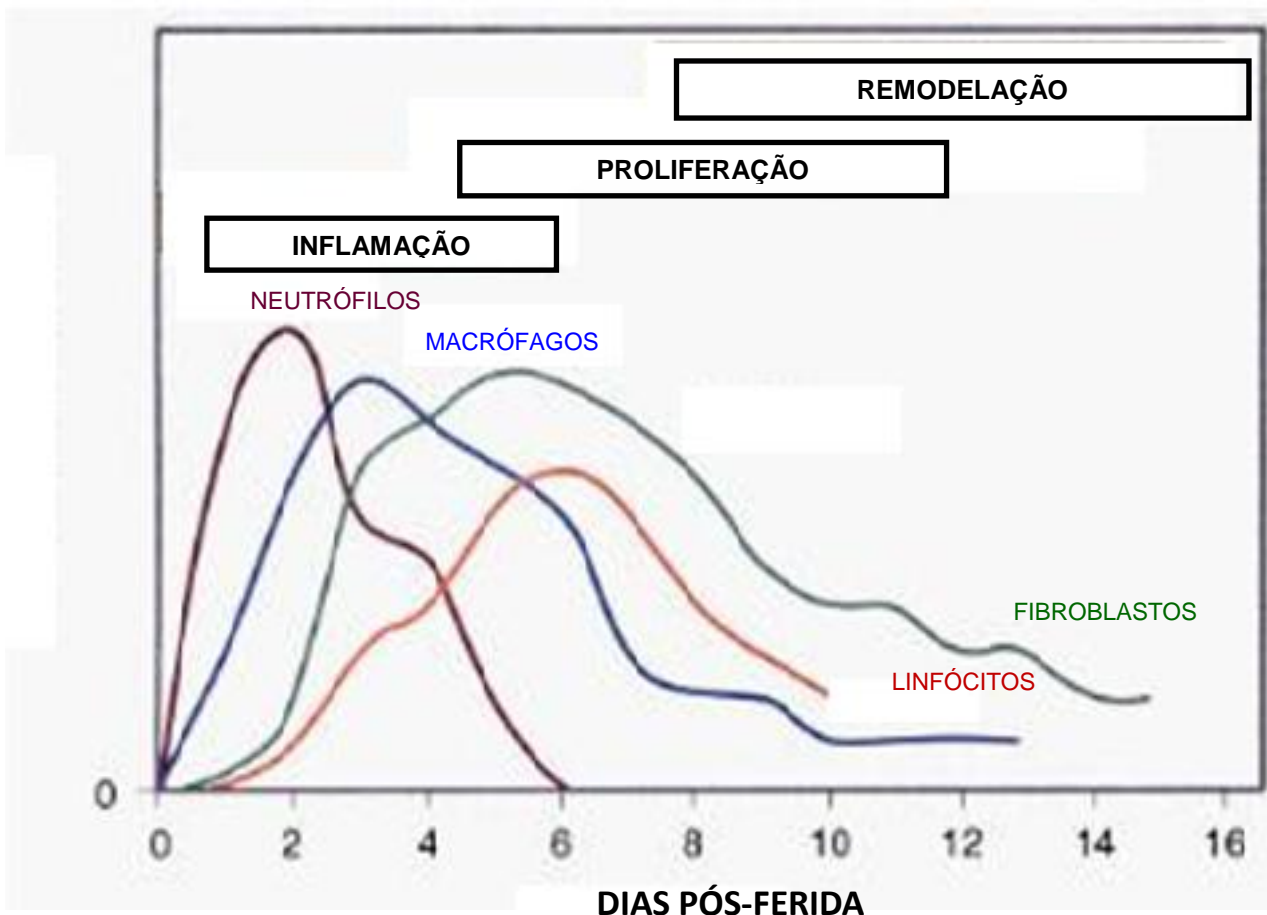


Figura 3 : Esquema do processo de cicatrização do tecido epitelial

Durante a fase inflamatória, ocorre hemostasia, migração de leucócitos e início da cascata de reparação tecidual. A fase proliferativa caracteriza-se pela fibroplasia, angiogênese e reepitelização e na fase de remodelação, o colágeno,

principal componente da derme, sofre “*turnover*” ocorrendo mudança do tipo de colágeno que compõe a matriz extracelular: o colágeno tipo III é inicialmente mais abundante que o tipo I e, ao longo deste processo, este vai sendo degradado ativamente enquanto que o colágeno I tem sua produção aumentada pelos fibroblastos [32].

Entendo esse processo de cicatrização pode-se intervir com o intuito de facilita-lo, a fase inflamatória pode ser diminuída ao acrescentar um agente com ação anti-inflamatória ou impedindo a ação de microrganismos que poderiam prolongar essa fase, essa ação pode ser obtida com a quitosana, que é obtida através da desacetilação da quitina com já foi dito, e com a prata, já a fase de proliferação e maturação pode ser reduzida com a quitosana e com o colágeno, pois ambos são biocompatíveis com a matriz extracelular do tecido e tem ação proliferativa.

2.5 QUITINA

A Quitina foi isolada pela primeira vez em 1811 por Braconnot, quando trabalhava com fungos. O termo Quitina do grego *Xitáv* (Túnica) foi utilizado pela primeira vez em 1823 por Odier para descrever o material biológico que envolvia os artrópodes. Isolada por Lassaigne em 1843, e identificada por Ledderhose em 1920 como sendo um polissacarídeo semelhante á celulose contendo ligações β -glicosídicas, diferindo desta última estrutura apenas pela substituição do grupamento OH do C – 2 por um grupo acetamídico.

A Quitina é um polissacarídeo de cadeia linear formado por unidades de N-acetil-2-desoxi-D-glicopirranose, que são interligadas por ligações glicosídicas β (1→4) (Figura 4), é o segundo biopolímero mais abundante, ficando atrás somente da celulose.

A quitina é encontrada em vários organismos vivos, como camarões, caranguejos, insetos e tartarugas, na parede celular de fungos, estruturas internas de invertebrados e exoesqueleto de artrópodes [35].

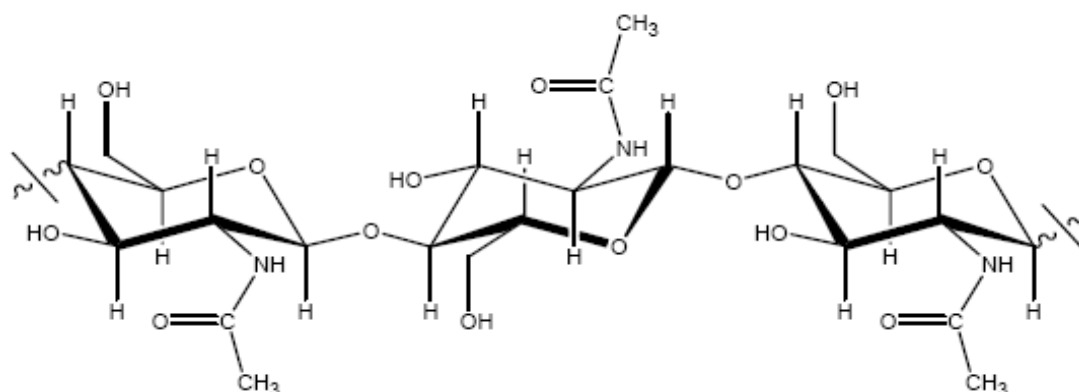


Figura 4 : Representação da estrutura molecular da Quitina (adaptado de Andrade, 2007)[36]

É bem conhecido que o problema de solubilidade da quitina resulta principalmente da estrutura semi-cristalina [37,38]. A quitina é um biopolímero estrutural único, que tem um papel semelhante ao da celulose em plantas terrestres e colágeno em animais superiores.

Animais tais como insetos e crustáceos produzem quitina em suas conchas, enquanto as plantas produzem celulose em suas paredes celulares, por tanto a quitina e a celulose são dois importantes polissacarídeos e estruturalmente associados que proporcionam proteção e integridade estrutural aos animais e plantas, respectivamente [39].

Quando encontrada na natureza, a quitina está associada a matrizes complexas com outros polissacarídeos que são removidos durante o processo de extração [40]. O processo para isolar e purificar a quitina normalmente consiste em três operações básicas que são a desproteção através de um tratamento básico a altas temperaturas, seguido da desmineralização, que é feito por tratamento com uma solução ácida aquosa e por fim, a despigmentação realizada por lavagens com solventes orgânicos.

2.6 QUITOSANA

A Quitosana é um copolímero obtido através da desacetilação de grupos acetamida da quitina [41,42], os grupos D-glicosamina (GlcN) e N-acetil-D-Glicosamina (GlcNAC) resultam na formação do copolímero de β -(1,4)-D-glicosamina e β -(1,4)-N-acetil-D-glicosamina [40,43] (Figura 5).

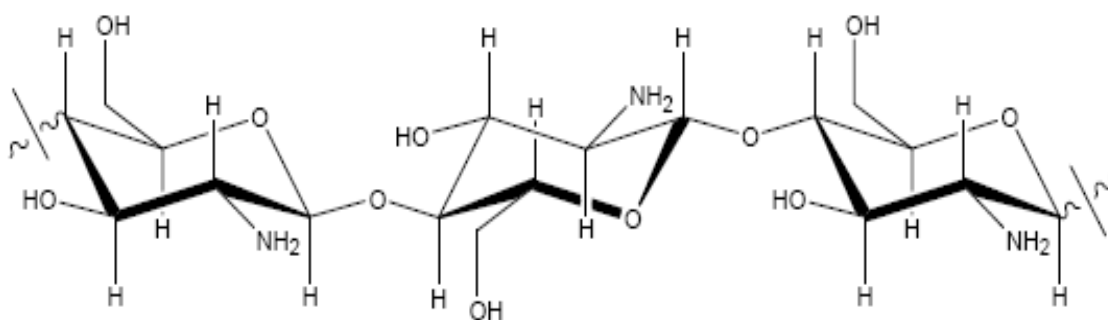


Figura 5: Representação da estrutura molecular da Quitosana (adaptado de Andrade, 2007)[36].

A Quitina e a Quitosana são consideradas polímeros heterogêneos, pois possuem em suas cadeia poliméricas tanto monômeros acetilados quanto desacetilados, isto porque, as formas totalmente acetiladas ou totalmente desacetiladas não ocorrem normalmente na natureza e são de difícil preparação em laboratório. Para diferenciar um polímero do outro usa-se uma regra comum: se o grau de desacetilação do polímero for igual ou maior que 60%, o polímero é denominado quitosana, caso contrário, é denominada quitina.

A quitosana é poliacatiônica em $\text{pH} < 6$ e interage prontamente com moléculas carregadas negativamente como proteínas, polissacarídeos aniônicos, ácidos graxos, ácidos biliares e fosfolípidos [44]. As propriedades químicas da quitosana são responsáveis pela vasta gama de aplicações em diferentes campos como apresentado na Tabela 3, na qual é descrito as diferentes aplicações deste biopolímero em diferentes áreas, podendo citar sua utilização na agricultura como defensivo agrícola, na indústria alimentícia como conservante e como bio-fármaco já que a mesma pode agir como agente hemostático, anticoagulante e bacteriostático.

Tabela 3: Aplicações da quitina e quitosana em diferentes setores (adaptado de A. Rafique *et al.*, 2016)[45].

Setor	Aplicações
Agricultura	Defensivo agrícola, revestimentos em sementes, liberação de fertilizantes e nutrientes no solo.
Agente antimicrobiano	Bactericida e fungicida.
Tratamento de água e resíduos	Remoção de íons metálicos, redução de odores e agente floculante.
Alimentos e bebidas	Não digerível por humanos, conservantes, espessantes e estabilizantes.
Qualidade nutricional	Ingredientes de ração para gado e aditivo para alimentação de peixes
Cosmético e produtos de higiene pessoal	Manter a umidade da pele, tratar a acne e melhoramento capilar.
Bio-fármacos	Imunológico, antitumoral, hemostático e anticoagulante e bacteriostático.
Aditivos	Agente emulsificante, agente de controle de textura, estabilização de cor e extensor de sabor.

Segundo Chen e colaboradores (2012) [46], a quitosana é um importante constituinte de biomateriais úteis para o tratamento de feridas, uma vez que é capaz de acelerar a cicatrização de lesões e a síntese de colágeno pelos fibroblastos na fase inicial de cicatrização, caracterizando-se como um polímero bioativo. No entanto, quando preparada na forma de filmes ou membranas, para utilização como curativos, por exemplo, sua resistência mecânica é baixa, assim como sua capacidade de absorver fluidos corpóreos. Uma alternativa para contornar tal limitação é a combinação de quitosana com outros materiais poliméricos [47,48]

Porém como observado na Tabela 4 a versatilidade da forma de como pode ser aplicada a quitosana contribui para sua exploração, as propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade e não-toxicidade da quitosana são alguns dos fatores, por exemplo, que a torna altamente explorada no campo farmacêutico e biomédico.

Tabela 4: Principais aplicações da quitina e quitosana em domínios farmacêuticos e biomédicos (adaptado de A. Rafique *et al.*, 2016) [45]

Formas	Aplicações
Nanopartículas	Liberação de fármacos, imobilização enzimática e encapsulação de fármacos.
Nanofibras	Cicatrização de feridas, regeneração óssea e suturas.
Filmes	Diálise e película antitumoral.
Pó	Adsorventes para dispositivos médicos.
Esponja	Tratamento de feridas, liberação de fármacos e pele artificial.
Soluções	Cosméticos, agente hemostáticos, antitumorais e liberação de genes.
Géis	Implantes e engenharia tecidual.
Comprimido	Excipiente.
Cápsulas	Veículo de liberação de fármacos.

Em relação à atividade antimicrobiana da quitosana e seu mecanismo de ação existem vários estudos na literatura, e sua atividade antimicrobiana tem recebido considerável interesse devido principalmente aos problemas encontrados na clínica médica referente à resistência bacteriana associada aos agentes antimicrobianos sintéticos.

A atividade bacteriana da quitosana esta relacionado a um mecanismo sequencial de separação entre a parede celular e membrana celular, seguida pela sua destruição, além da lise celular e alteração da pressão osmótica [49]. A quitosana tende a atuar nos peptidoglicanos da parede celular bacteriana, alterando sua permeabilidade.

Acredita-se que ocorre interação eletrostática entre as cargas positivas dos grupos amino protonados da quitosana com as moléculas carregadas negativamente na superfície celular do microorganismo, o que acarreta em um aumento da permeabilização da superfície celular, levando a uma fuga de material intracelular do microorganismo resultando na morte celular [45, 50, 51].

A ação antimicrobiana da quitosana é dependente de vários fatores, dentre eles, pode-se citar a massa molecular, em um trabalho feito por Lee e colaboradores (2009) [49] avaliaram o peso molecular da quitosana e sua influência na atividade antimicrobiana, e constataram que o aumento da massa molecular aumenta a atividade contra bactéria gram-positivas, no entanto a menor a massa aumenta sua atividade contra as gram-negativas.

O pH do meio também influencia na atividade antimicrobiana da quitosana, uma vez que as cargas positivas do grupo amino, presente em sua estrutura, pode interagir com sítios na superfície celular da bactéria ocasionando distúrbios na permeabilidade celular [44].

Ainda em relação a ação bactericida e bacteriostática da quitosana, essa tem várias vantagens sobre os outros agentes , pois a quitosana possui uma elevada atividade antimicrobiana, amplo espectro de atividade, e uma baixa toxicidade para células de mamíferos.

Geralmente leveduras e bolores são o grupo mais sensível, seguido por bactérias gram-positivas e gram-negativas, e sua atividade inibidora é maior em pH ligeiramente ácido (pH~6,0) [44].

Dentre os microrganismos que tem seu crescimento inibido estão *Escherichia coli*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *K. pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Shigella dysenteriae*, *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Vibrio sp.*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Corynebacterium michiganense*, *Erwinia sp.*, *Kocuria rhizophila*, *Pseudomonas fluorescens*, *Xanthomonas campestris*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Drechslera sorokiniana*, *Micronectriella nivalis*, *Procularia oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Tricophyton equinum* e leveduras do gênero *Cândida* [52]

2.7 COLÁGENO

O colágeno é uma proteína sintetizada por células do tecido conjuntivo denominadas de fibroblastos (Figura 6), no corpo humano o colágeno representa mais da metade das proteínas totais e 70% do peso seco da pele, além de ser o constituinte mais importante da matriz extracelular [53].

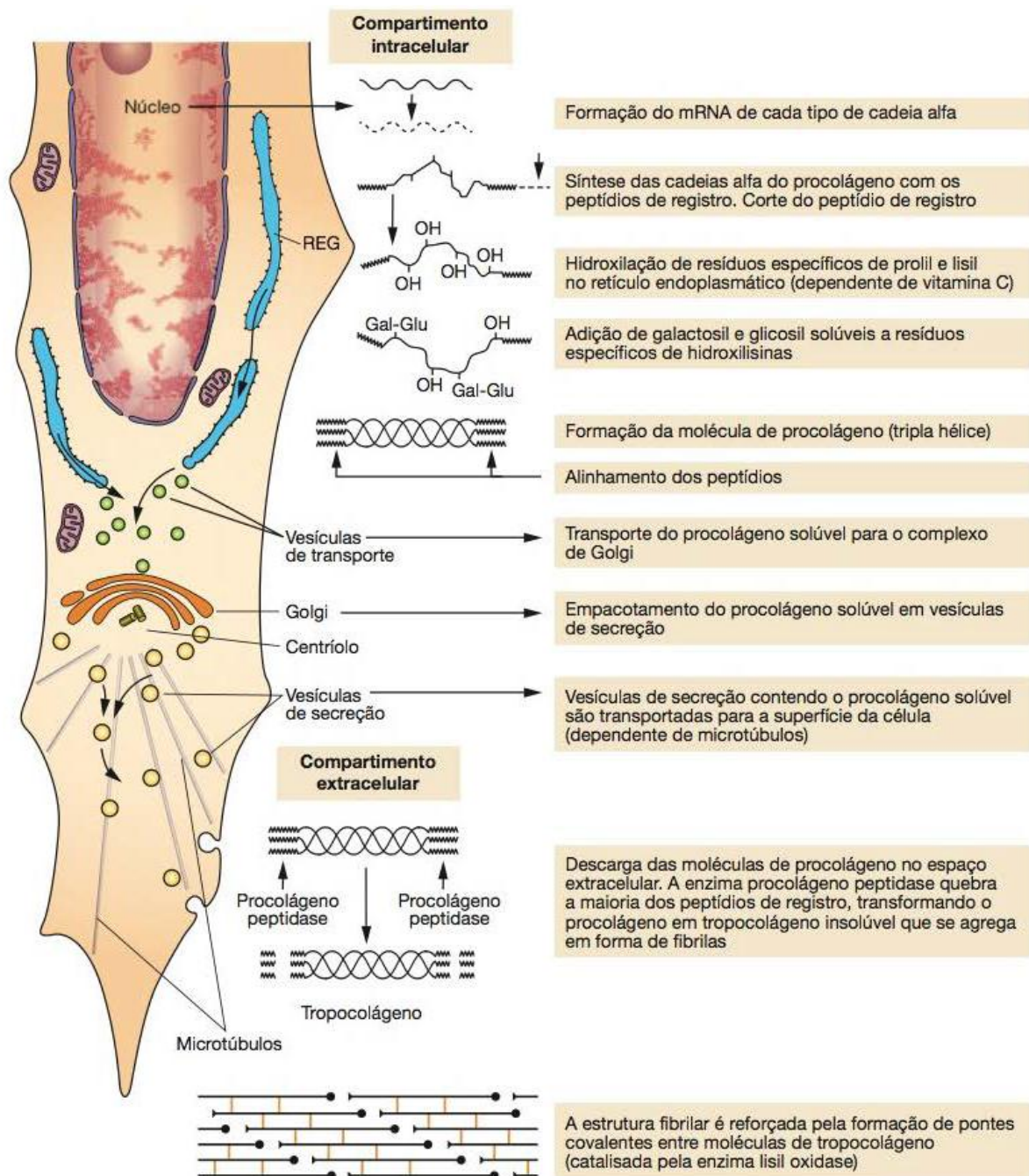


Figura 6: Representação esquemática que mostra as etapas intracelulares da síntese do colágeno e a fibrilogênese do colágeno que ocorre no espaço extracelular [1].

A unidade básica do colágeno é o tropocolágeno que é formado por cadeias de polipeptídeos que se entrelaçam em formato helicoidal formando uma molécula linear [54].

Na forma mais abundante de colágeno (tipo I), cada molécula (tropocolágeno) é composta por duas cadeias peptídicas do tipo $\alpha 1$ e uma do tipo $\alpha 2$, cada uma delas com massa molecular de aproximadamente 100 kDa. As cadeias alfa são enroladas em alfa-hélice com giro à direita, sendo mantidas juntas por pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas (Figura 7).

Cada volta completa da hélice percorre uma distancia de 8,6 nm. Cada molécula de tropocolágeno tem 280 nm de comprimento de 1,5 nm de espessura. nm, nanômetro [1].

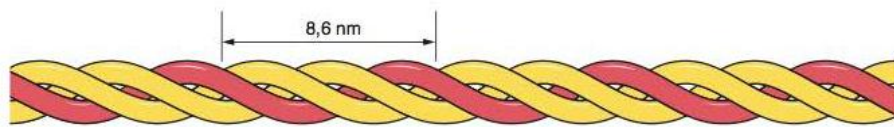


Figura 7: Representação esquemática do tropocolágeno [1].

O colágeno tipo I pode ser encontrados na pele, tendões, ligamentos e ossos, esta proteína macromolecular constituída de três cadeias polipeptídicas (duas $\alpha 1$ e uma $\alpha 2$) em sua porção central e nas extremidades amínica e carboxílica permanecem na forma globular [55].

As fibrilas de colágeno são estruturas finas e alongadas com diâmetro variável (20 a 90 nm) e que podem alcançar vários micrômetros de extensão. Elas contêm estriações transversais com uma periodicidade característica de 64 nm determinada pela sobreposição das moléculas de tropocolágeno (Figura 8).

A tripla hélice contém 100 resíduos de aminoácidos de composição variada, esta diversidade de composição de aminoácidos das cadeias α leva à classificação de pelo menos quatro tipos de colágeno principais, porém em cada um dos tecidos pode haver mais de um tipo de colágeno [1]. No colágeno tipo I, uma cadeia de polipeptídios comum apresenta aproximadamente 1.014 resíduos de aminoácidos com uma sequência repetida ao longo da cadeia de $(\text{Gly-X-Y})_n$, Gly é o aminoácido

glicina, X quase sempre é prolina e o Y, hidroxiprolina ou hidroxilisina [1]

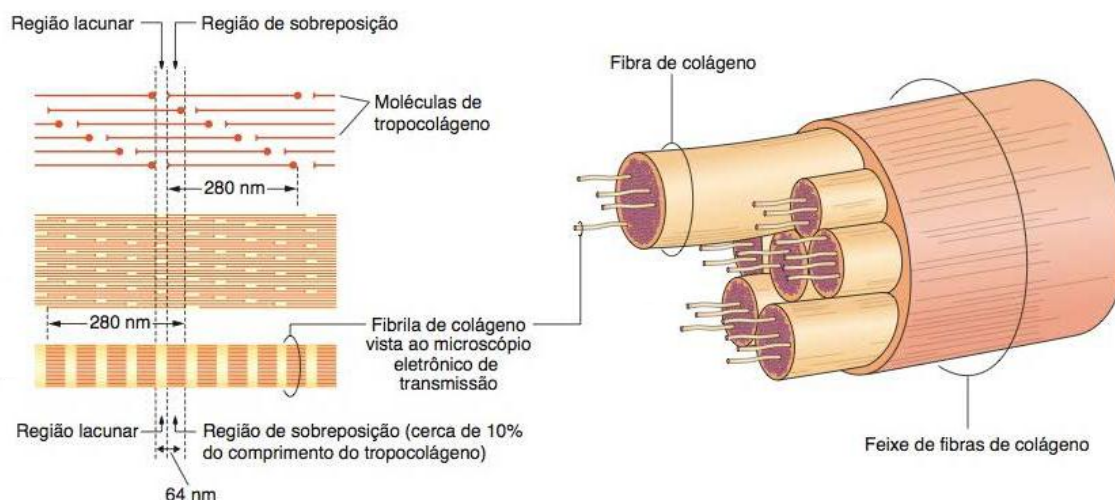


Figura 8: Desenho esquemático mostrando como as moléculas de colágeno (tropocolágeno) se agregam para formar fibrilas, fibras e feixes [1].

O colágeno tem sido aplicado na fabricação de membranas bioativas, pois as mesmas servem como suporte para crescimento celular, além de veicular fármacos ou liberar outras substâncias com propriedades anti-inflamatória, antibacteriana e antioxidante no local da lesão [56].

Com ampla aplicabilidade no campo da cicatrização de feridas, o colágeno tem se mostrado um importante biomaterial, entretanto as membranas de colágeno puro podem apresentar limitações decorrentes de sua baixa força mecânica, fraca barreira ao vapor d'água, alta solubilidade em água e rápida biodegradabilidade pois, quando aplicadas sobre feridas, as membranas de colágeno podem sofrer ações enzimáticas decorrente da presença de gelatinases e outras proteases, fazendo com que sejam mais rapidamente reabsorvidas pelo organismo [57].

2.8 NANOCIÊNCIA E NANOPARTÍCULAS

Atualmente, o avanço na nanotecnologia possibilitou a síntese e caracterização de uma série de nanoestruturas, e como as nanopartículas provaram, no decorrer dos anos, terem inúmeras aplicações, especialmente medicinais, pela

ação dos íons e metais reduzidos contra bactérias e fungos patogênicos, graças à sua interação com células vivas.

As nanotecnologias podem ser definidas como o design, a produção e a aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas, controlando a forma e o tamanho em escala nanométrica. Nanopartículas, de acordo com ASTM (*American Society for Testing and Materials*), são partículas com comprimentos que variam de 1 a 100 nm em duas ou três dimensões.

Durante séculos, a prata tem sido utilizada para o tratamento de queimaduras e feridas crônicas, em 1000 a.C. a prata já era utilizada para tornar a água potável e ao final do século XIX, era comum a prática de usar solução de AgNO_3 (1% m/V) em curativos para reduzir infecções pós-operatórias oculares [17].

A resistência antibacteriana de microorganismos é uma das principais problemas enfrentados no campo do cuidado e gestão de feridas resultando em complicações, como infecção e dificuldade na cicatrização. Atualmente, muitas pesquisas estão focadas no desenvolvimento de antibacterianos mais novos para tratar feridas infectadas com microorganismos resistentes. A prata foi usada como agente antibacteriano há muito tempo sob a forma de metal e sulfadiazina de prata. Recentemente, as nanopartículas de prata surgiram como potentes agentes antibacterianos e estão encontrando diversas aplicações médicas.

As nanopartículas de prata têm fundamental importância, pois seu amplo espectro de atuação antibacteriano, inclui bactérias gram-positivas e gram-negativas, fungos filamentosos, leveduras e vírus, além de possuir baixa toxicidade para as células humanas, ação anti-inflamatória [11] e ação cicatrizante [19].

O efeito inibitório da prata em microorganismos é provavelmente devido ao somatório de mecanismos de ação distintos. Vários estudos sugerem que os íons de prata reagem com os grupos tióis (SH) das proteínas de membranas das bactérias [57], daí, as nanopartículas de prata se ligam à membrana celular e também penetram no interior das bactérias, além da prata interagir como os compostos contendo fósforo do DNA bacteriano, estes conjuntos de ações desencadeado pela

prata na célula bacteriana acarretam em inativação da bactéria e consequentemente sua morte.

As nanopartículas de cloreto de prata (AgCl_{NP}) tem atraído muita atenção recentemente devido sua promissora aplicação [58,59], as mesmas já foram utilizadas como material catalisador, semiconductor iônico e agente antibacteriano [60,61] e podem ser produzidas por diferentes métodos físicos ou químicos, incluindo a redução química, sintetização reversa à base de micelas, irradiação ultrassônica, electrospinning e microemulsão [62]. Estes métodos exigem a manutenção de condições específicas de temperatura e pressão através de equipamento sofisticado e / ou o uso de produtos químicos biologicamente perigosos que produzem resíduos tóxicos ao ambiente. As características dos métodos físicos ou químicos de síntese das AgCl_{NP} limitam seu uso para aplicações farmacêuticas e biomédicas.

No trabalho de Yan-Yu e colabs. (2016) sintetizaram nanopartículas de prata utilizando extrato de ginkgo biloba e testaram a ação bactericida das nanopartículas de prata frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas e com uma solução de 10 μL /disco obtiveram uma faixa de inibição em torno de 12 mm [63].

Já no trabalho de Archana e colabos. (2014) prepararam filmes de quitosana, polivinilpirrolidona (PVP) e nanopartículas de óxido de prata e avaliaram quanto a citotoxicidade e atividade antibacteriana frente a *S. aureus* e *E. coli* onde obtiveram resultados satisfatórios com diferentes concentrações de nanopartículas de prata [64]

Patra e Baek (2016) realizaram um estudo onde sintetizar nanopartículas de cloreto de prata usando uma solução aquosa extrato de casca exterior de fruta de pêsego (*prunus persica* L.) onde avaliaram a atividade antibacteriana e potencial antibacteriano das nanopartículas contra cinco bactérias patogênicas transmitidas pelos alimentos, esse estudo constatou que as nanopartículas de cloreto tem fortes potenciais antibacterianos (zona de inibição de 9,01 a 10,83 mm) [65]

2.9 FERRAMENTAS DE ANÁLISE

2.9.1 Espectroscopia de Infravermelhos com transformadas de Fourier

A técnica de caracterização de materiais por infravermelho baseia-se na observação da frequência (análise qualitativa identificando o tipo de ligação química) e intensidade (análise quantitativa medindo a concentração da ligação química) de radiação infravermelha absorvida quando um feixe desta radiação atravessa a amostra [66].

As ligações covalentes em moléculas estão constantemente vibrando. Assim, quando dizemos que uma ligação entre dois átomos possui determinado comprimento, estamos especificando uma média, porque a ligação se comporta como se ela fosse uma mola que vibra conectando dois átomos. Uma ligação vibra tanto com movimentos axiais quanto angulares. A deformação axial é uma vibração que ocorre ao longo da linha de ligação e que modifica o comprimento de ligação. A deformação angular é uma vibração que não ocorre ao longo da linha de ligação, mas modifica o ângulo da ligação. Uma molécula diatômica, por exemplo, o H-Cl (Figura 9) pode sofrer apenas uma deformação axial, uma vez que não possui ângulos de ligação [67].

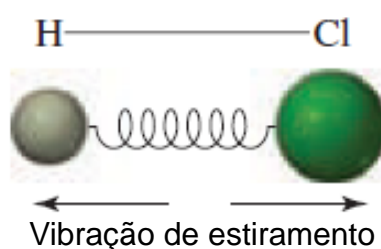


Figura 9: Estrutura geométrica do HCl [67]

As vibrações de uma molécula que contem três ou mais átomos são mais complexas (Figura 10), tais moléculas podem sofrer deformações axiais e angulares simétricas e assimétricas, e as deformações angulares podem ser tanto no plano quanto fora do plano. As deformações angulares são normalmente descritas pelos termos balanço (*rock*), tesoura (*scissor*), abano (*wag*) e torção (*twist*) [67].

Cada vibração de deformação axial e angular de uma ligação molecular ocorre em uma frequência característica. Quando uma substância é bombardeada com radiação em uma frequência que atinge exatamente a frequência de uma de suas deformações, a molécula absorverá energia. Isso permite que as ligações sofram um pouco mais deformações axiais e angulares. Assim, a absorção de energia aumenta a amplitude da deformação, porém sem modificar sua frequência.

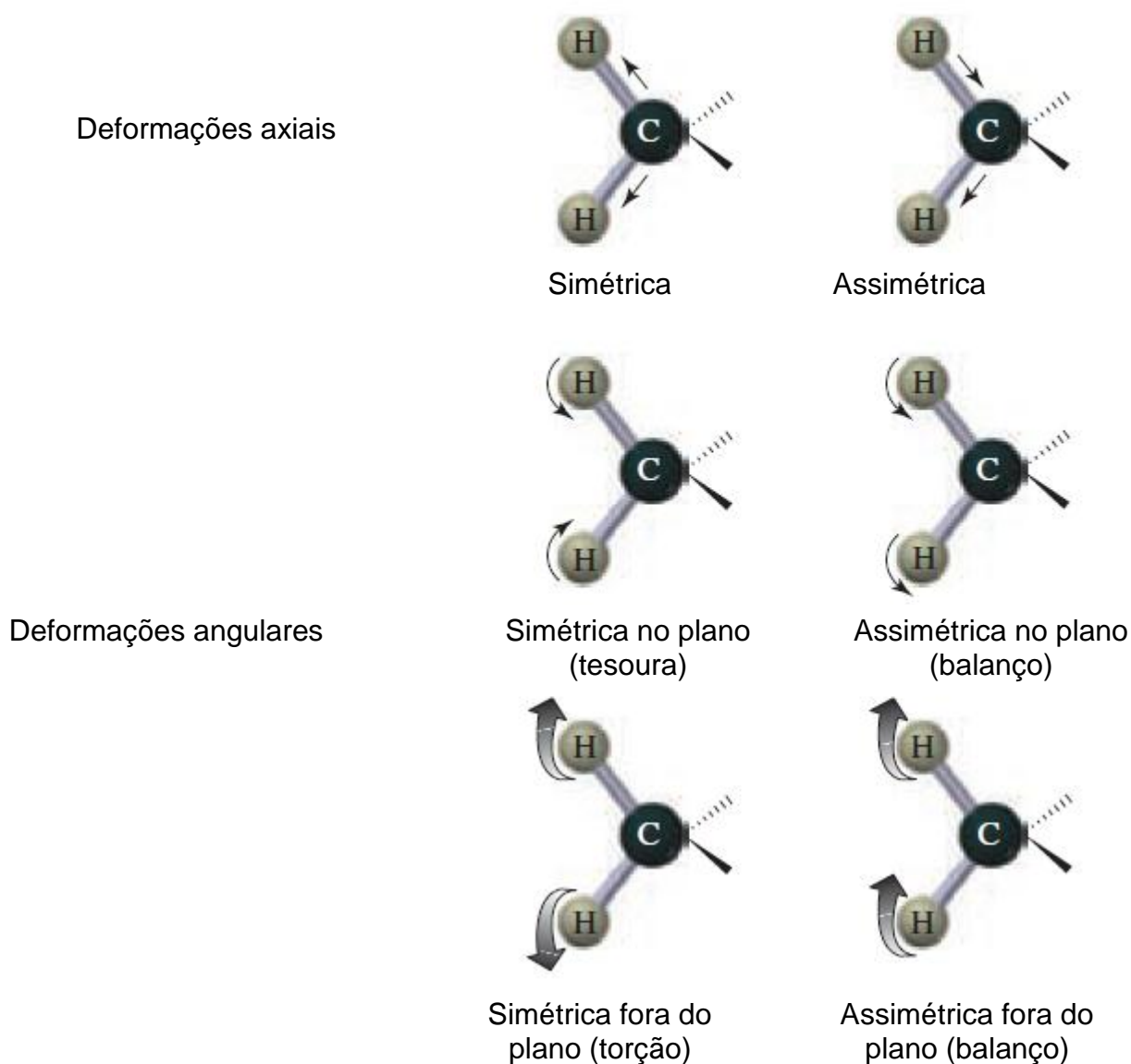


Figura 10: Deformações axiais e angulares de ligações em moléculas orgânicas [67]

A espectroscopia no infravermelho é uma das ferramentas de caracterização de materiais poliméricos mais utilizadas. A análise vibracional de polímeros pode fornecer informações em três importantes aspectos estruturais: composição química,

estrutura configuracional e conformacional. Além disso, fornece também indicações de forças interatômicas devido à presença de interações moleculares [66].

Para que uma molécula absorva radiação no infravermelho, é necessário que ocorra uma alteração no momento dipolar da molécula, devido aos seus movimentos de deformações axiais e angulares. A incidência de radiação infravermelha na molécula na mesma frequência da vibração de uma de suas ligações aumentará a amplitude desta vibração, absorvendo parte da energia incidente, reduzindo a intensidade da radiação transmitida, gerando um espectro de infravermelho característico do material em análise [66].

A base de qualquer espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é o interferômetro de Michelson (Figura 12). Nesse sistema, a radiação de uma fonte monocromática hipotética é dividida em dois feixes, cada um correspondendo idealmente a 50% do original, no "beamsplitter" (divisor de feixe). Um dos feixes (A) segue em direção ao espelho de posição fixa no qual reflete de volta para o "beamsplitter", onde parte deste feixe reflete de volta para a fonte e parte vai para o detector. O outro feixe (B) parte do "beamsplitter" em direção ao espelho móvel. O espelho móvel também reflete o feixe B, parte de volta para a fonte e parte para o detector.

Se a posição do espelho móvel é tal que o feixe B percorre a mesma distância que o feixe A antes de chegar ao detector ($\delta = n\lambda$, onde $n=0,1,2,\dots$), então os dois feixes estão em fase, reforçando um ao outro (interferência construtiva) e, neste caso, a energia que chega ao detector será máxima. Por outro lado, se a posição do espelho móvel for tal que o caminho do feixe B seja diferente daquele do feixe A por $(n+1)\lambda/2$, então os dois feixes estarão 90° fora de fase, cancelando um ao outro. A energia que chega no detector, nesse caso, será mínima.³¹

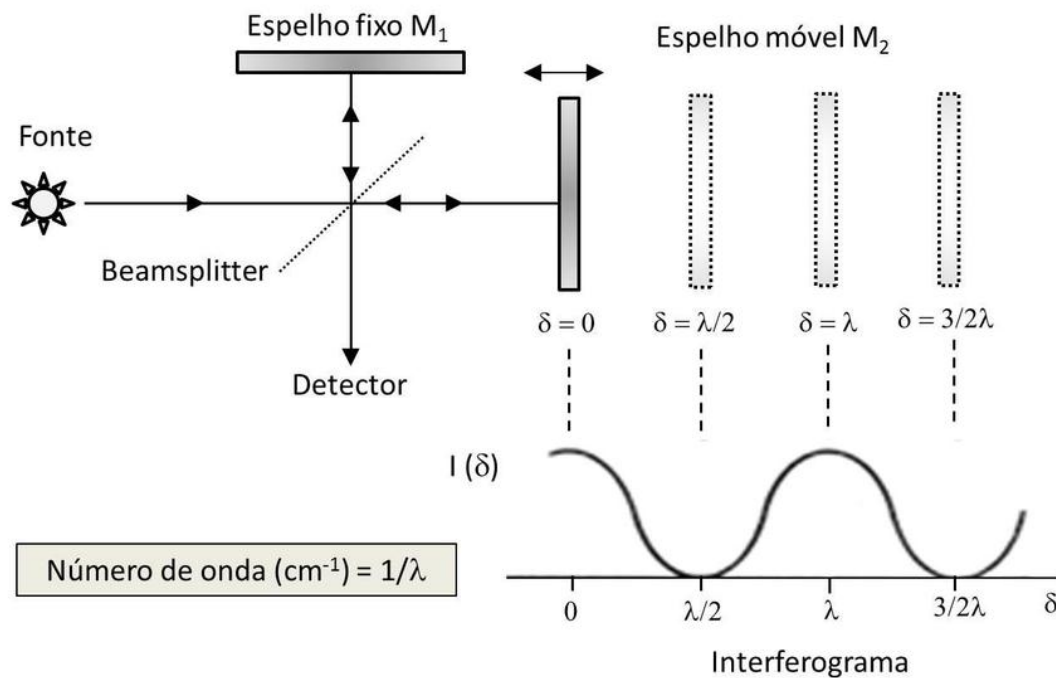


Figura 111: Diagrama mostrando os principais componentes de um espectrômetro FTIR [68].

Portanto, à medida que o espelho móvel percorre determinada distância, um interferograma, como o mostrado na Figura 12, é formado. A intensidade da radiação que chega no detector, $I(\delta)$, varia como uma função cosseno da retardação óptica δ e essa informação é convertida em espectro, relacionando-se as intensidades com as respectivas frequências, através da transformada de Fourier.

2.9.2 Difração de raios X (DRX)

O fenômeno da difração ocorre quando uma onda incide em uma série de obstáculos regularmente espaçados que possuem espaçamento da mesma ordem de grandeza do comprimento da radiação incidente e são capazes de difratar a onda [69].

Os raios X são um tipo de radiação eletromagnética de alta energia que possuem comprimento de onda da mesma ordem de grandeza do que os espaçamentos interatômicos em sólidos cristalinos [69]. Quando os raios X incidem sobre um material sólido (Figura 12), uma fração da radiação é espalhada pela

densidade eletrônica associada a cada átomo ou íon que se encontra na trajetória do feixe [69].

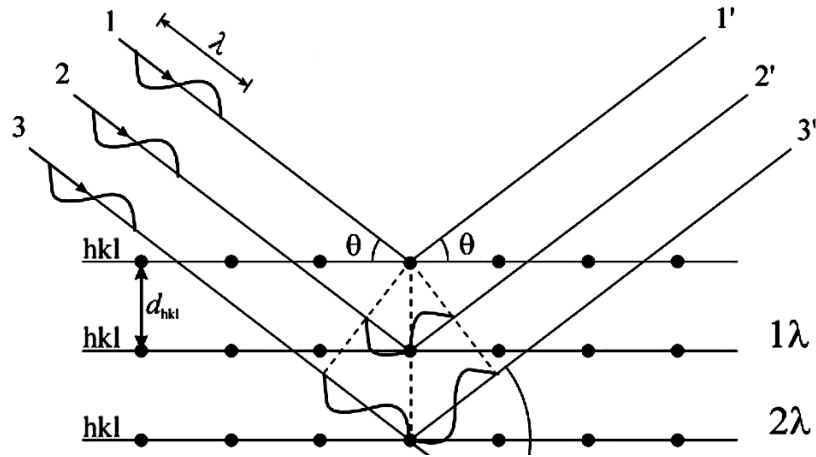


Figura 12: Difração de raios X[70].

O resultado desta interação é um padrão de difração que obedece a lei de Bragg (Equação 01), de modo que a diferença de caminho entre as ondas espalhadas (distância entre os planos atômicos) seja igual a um múltiplo inteiro do comprimento de onda da radiação incidente, caso contrário os picos de difração podem não ser formados [69]

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad (\text{Eq. 01})$$

2.9.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O microscópio eletrônico de varredura (Figura 13) padrão consiste em uma torre no topo da qual ocorre emissão termiônica ou por efeito de campo de elétrons a partir de um filamento (cátodo) de tungstênio ou hexaboreto de lantânio (LaB_6). Os elétrons são acelerados e atravessam um ânodo. O feixe eletrônico é então focalizado por lentes condensadoras que o alinham em relação à abertura da objetiva. Esta, por sua vez ajusta o foco do feixe antes que ele chegue na amostra, passando através de pares de bobinas de varredura e pares de placas de deflexão na coluna do microscópio [71].

Quando o feixe interage com a amostra diferentes tipos de radiação são emitidos: raios X de frenagem (*Bremstrahlung*), raios-x característicos (fluorescência), radiação eletromagnética na região do infravermelho, do visível e do ultravioleta, elétrons secundários, elétrons retro-espalhados e elétrons Auger. Na microscopia eletrônica de varredura os sinais de maior interesse são os elétrons retro-espalhados (colidem elasticamente com os átomos da superfície da amostra) e os elétrons secundários (emitidos devido a colisões inelásticas dos elétrons primários com os átomos da amostra).

Os microscópios eletrônicos de varredura possuem sistemas para detecção para ambos os casos. Os elétrons secundários produzem imagens da morfologia da amostra e o contraste nas imagens geradas por elétrons retro-espalhados carrega informação qualitativa a respeito da composição do material (são sensíveis à densidade eletrônica local).

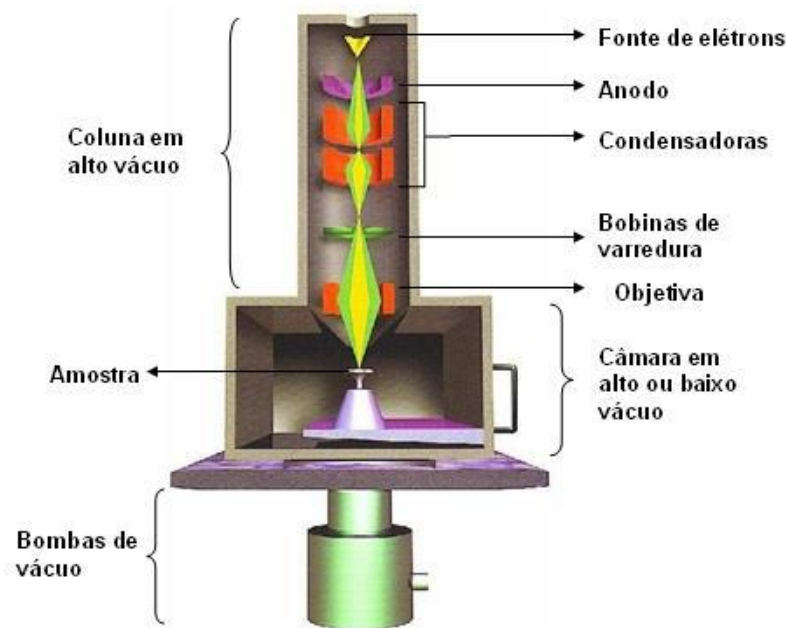


Figura 13: Ilustração esquemática do MEV (adaptada) [72]

2.9.4 Energia dispersiva de raios X (EDX)

A técnica de EDX é capaz de fornecer informações qualitativas ou quantitativas a respeito da composição de amostras contendo elementos químicos com número atômico maior do que três ($Z > 3$) por meio da excitação por raios X [73]. Cada

elemento na amostra emite fótons de raios X em um comprimento de onda característico devido a quantização dos níveis de energia. O equipamento, então, coleta estes fótons de modo a identificar quais elementos estão presentes na amostra.

Este tipo de análise, também denominado espectroscopia de energia dispersiva (EDS), usa um material semicondutor, para detectar os raios X, e um analisador multicanal e converte a energia de raios X em uma contagem eletrônica. A partir do valor acumulado destas contagens é criado um espectro que representa a análise química da amostra. Para a análise quantitativa dos elementos, deve-se utilizar padrões com concentrações conhecidas dos elementos a serem analisados [73].

Os raios X característicos permitem a obtenção de um mapa de imagem da distribuição de um elemento em uma amostra não-homogênea. Quando um elétron, geralmente do feixe primário, interage inelasticamente com a amostra removendo um elétron de uma camada interna (K, L, M, N) deixa o átomo em um estado excitado de energia permitindo que um elétron de uma camada mais energética decaia para preencher o vazio. Este decaimento ocorre com emissão de energia na forma de um fóton de raios X. Como as diferenças de energia são bem definidas e específicas dos elementos estes fótons são denominados raios-X característicos e permitem identificar o elemento que está emitindo a radiação.

2.9.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

O MET transmite o feixe de elétrons com uma certa aceleração para que os elétrons ultrapassem a amostra. Os elétrons vão se comportar de maneira diferente de acordo com os metais nas amostras, alguns ficando retidos, outros passando direto e com velocidades diferentes. Então um detector de elétrons os recebe e transmite para tela em forma de imagem com tons de cinza.

A imagem no MET é obtida devido às mudanças de amplitude e fase que o feixe de elétrons sofre ao atravessar o material. Assim sendo, há basicamente dois

tipos de contrastes para formação de imagens: contraste de amplitude e contraste de fase.

Um filamento de tungstênio aquecido promove a emissão termo-iônica de elétrons que são acelerados em um tubo sob alto vácuo em direção à amostra. A tensão aplicada varia entre 60 keV e 400 keV, sendo valores típicos na faixa de 75-100 keV. Um requisito básico para as amostras, além da estabilidade em alto vácuo, é a espessura reduzida, geralmente inferior a 200 nm. Este valor pode variar dependendo do material, uma vez que o feixe eletrônico deverá ser transmitido através da amostra. O feixe eletrônico transmitido incide sobre uma tela fluorescente, um filme fotográfico ou uma câmera de vídeo, gerando a imagem da amostra (Figura 14).

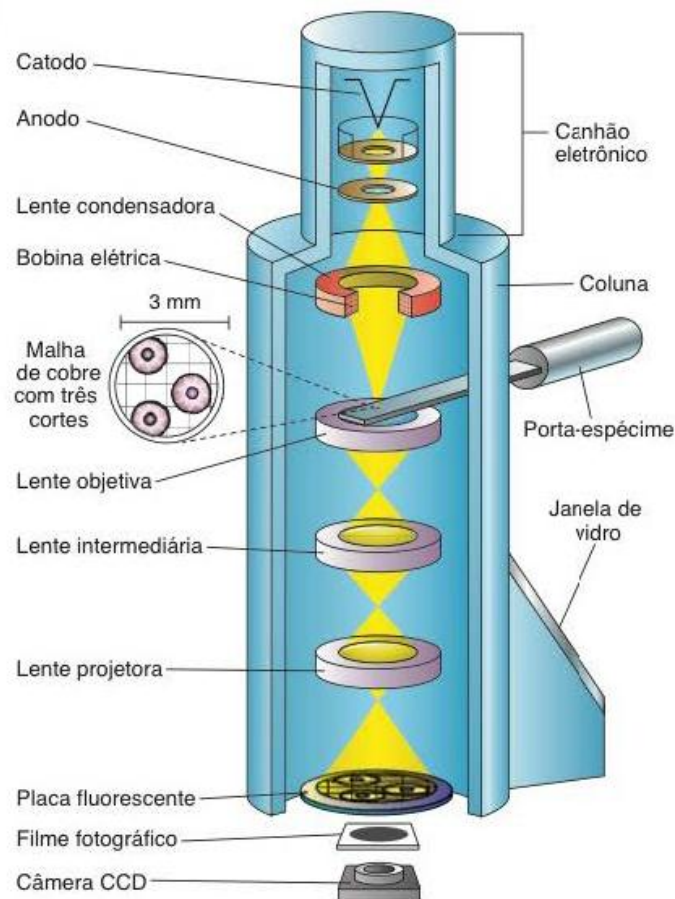


Figura 14: Desenho esquemático de um microscópio eletrônico de transmissão [1]

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Sintetizar e caracterizar membranas poliméricas constituídas por quitosana e colágeno, com inclusão de nanopartículas de prata.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar e caracterizar membrana de Quitosana (QUI) com colágeno (COL) e com inclusão de nanopartículas de cloreto de prata (AgCl_{NP});
- Preparar e caracterizar nanopartículas AgCl_{NP} pelas técnicas difratometria de raios X, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e por microscopia eletrônica de transmissão (TEM);
- Caracterizar as membranas pela técnica de espectroscopia no infravermelho (FTIR);
- Preparar membranas QUI – COL em diferentes proporções (m/m);
- Caracterizar as membranas morfológicamente por microscopia MEV.

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 METODOLOGIA

4.1.1 Purificação da quitosana

A quitosana utilizada foi obtida previamente pelo trabalho de Silva, *et al.* em 2011[74], que gerou a patente PI11064145. Partindo dessa quitosana foi realizado a purificação da mesma, seguindo a seguinte sequência: dissolução de 2g do material amorfo (PI11064145) [74] em 100 mL de solução, 0,5 mol/L de ácido acético (PA, Proquimios) em agitação magnética a temperatura ambiente por 24h, filtrou-se a suspensão a vácuo (Filtro Qualy, J.Prolab. poros 12,5 μm) em seguida ao filtrado (Figura 16) adicionou-se cerca de 20% (v/v) de hidróxido de amônio (PA, Proquimios), em relação ao filtrado obtido, de para precipitação da quitosana, após o sistema é acondicionado sob refrigeração (4°C) por 48 h, decorrido esse período o sobrenadante foi retirado cuidadosamente com auxílio de uma pipeta de 10 mL, até retirada completa do sobrenadante. O precipitado foi então acondicionado em placas de Petri e levado à estufa com circulação de ar (45°C) para a secagem (~48h), após a secagem, o material sólido foi retirado das placas de Petri por raspagem e acondicionado para análise.

4.1.2 Síntese das Nanopartículas de prata

A síntese das nanopartículas de cloreto de prata (AgCl_{NP}) a partir do nitrato de prata (AgNO_3) foi baseada no trabalho de Loza K, *et al.*(2014)[75] com modificações. Usando o filtrado da purificação da quitosana, obtido segundo a metodologia descrita anteriormente (seção 4.1.1), uma aliquota de 50 mL desse filtrado foi retirada e acondicionada em erlenmeyer (100 mL), em seguida adicionou 2 mL da solução 25 milimol/L de AgNO_3 (Vetec), e levado a agitação com agitador magnético por 2h com aquecimento a 80°C. A seguir, a suspensão obtida (Figura 15) foi centrifugada por 30 min a 5000 rpm, o sobrenadante foi dispensado e o precipitado de AgCl_{NP} agregado a quitosana foi lavado e seco em estufas de circulação de ar (45°C).

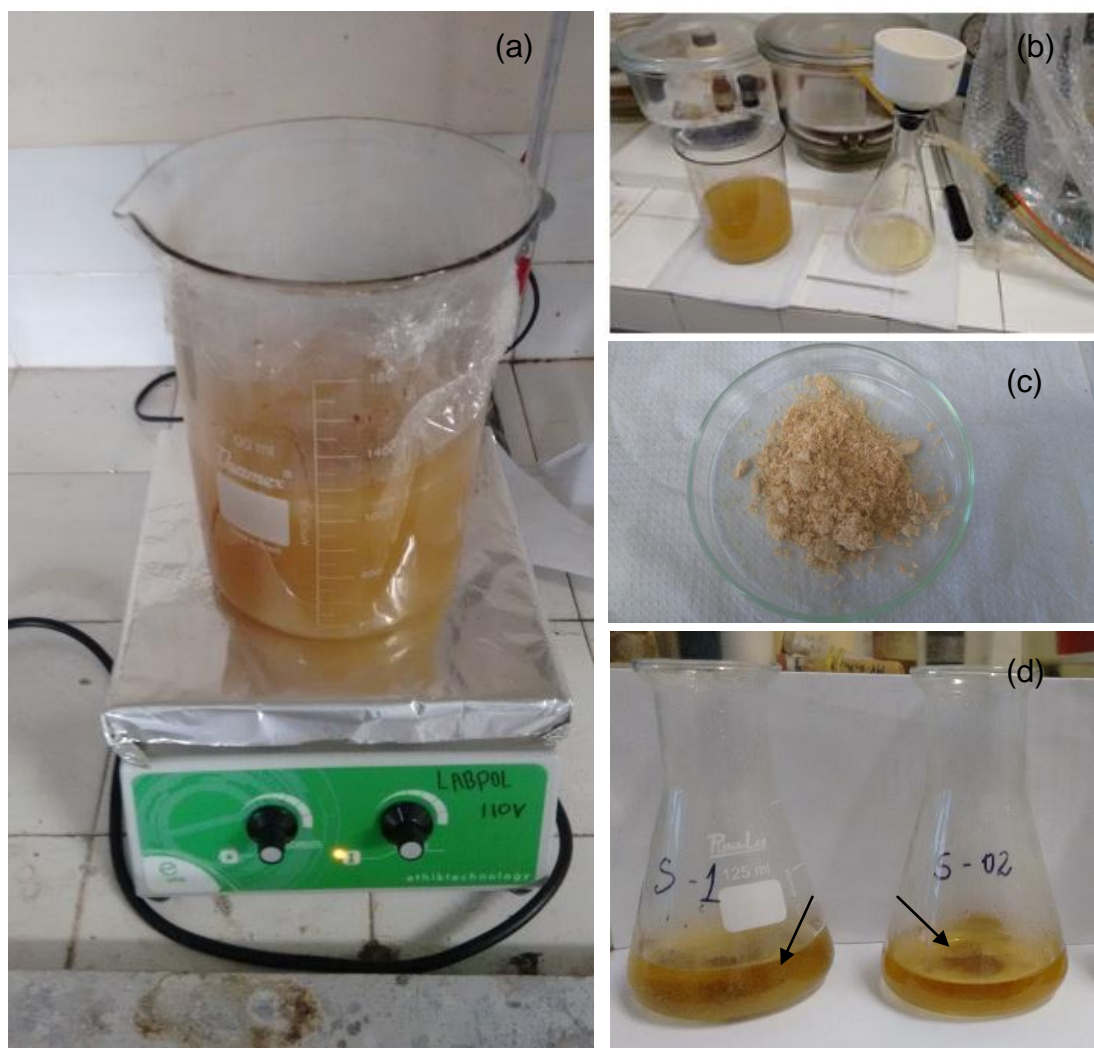


Figura 15: Etapa de purificação e síntese das AgCl_{NP} , (a) agitação; (b) filtração e (c) material da patente PI11064145 e (d) precipitado obtido na síntese das AgCl_{NP} as setas indicam a coloração desse precipitado.

4.1.3 Síntese das membranas de quitosana-colágeno

Foram preparadas 100 mL de uma solução 1,5% (m/v) de cada polímero a temperatura ambiente, dissolvendo cada polímero, quitosana purificada (seção 4.1.1) e colágeno (98%, NovaProm® Food Ingredients) em solução de ácido acético (Dinâmica Produtos Químicos) 5%, m/v. Após o preparo das soluções, retirou-se uma alíquota de 10 mL da solução de quitosana, acondicionou-se em erlenmeyer de 100 mL com adição de 1mL de solução 5% (v/v) de glutaraldeído (Dinâmica Produtos Químicos) e a mistura foi submetida a agitação por 30 min e em seguida adicionou-se alíquotas diferentes da solução de colágeno 1,5% (m/v) para obtenção de soluções quitosana/colágeno em diferentes proporções (m/m) (1:1, 1:2, 2:1, 3:1 e 1:3) mantendo a agitação por mais 2 h. Em seguida a mistura polimérica foi

transferida para formas de polipropileno para secagem a temperatura ambiente (25 °C) por 7 dias.

4.1.4 Síntese das membranas de quitosana - colágeno carregadas com Nanopartículas de prata

Foram preparadas 100 mL de solução 1,5% (m/v) dos polímeros a temperatura ambiente, dissolvendo-se cada polímero, a quitosana e o colágeno (98%, NovaProm® Food Ingredients) em soluções de ácido acético (Dinamica Produtos Químicos) 5% m/v. A seguir uma alíquota de 10 mL da solução de quitosana foi retirada, acondicionada em erlenmeyer de 100 mL a qual adicionou-se 1mL de uma solução 5% v/v, de glutaraldeído (Dinâmica Produtos Químicos) agitando por 30 min adicionando em seguida 10 mL da solução de colágeno (1,5%) com agitação por 30 min. A essa mistura polimérica foi adicionado 12 mg do precipitado de AgCl_{NP} – Quitosana sintetizado de acordo com a seção 4.1.2. Essa mistura polimérica carregada com nanopartículas de prata foi transferida para formas de polipropileno para secagem a temperatura ambiente (25°C) por 7 dias.

4.1.5 Espectroscopia de Infravermelhos com transformadas de Fourier (FTIR)

As amostras de quitosana, colágeno, quitosana-nanopartículas de prata e as membranas foram analisadas por FTIR utilizando o aparelho de infravermelho SPECTRUM 400 da Perkin Elmer, a 18 °C e pressão ambiente. Todas as análises foram feitas no estado sólido.

4.1.6 Difração de raios X (DRX)

As análises de padrão de difração de raios X foram feitas no núcleo de competências em química do petróleo (NCQP – LabPetro) com o aparelho D 8 DISCOVER, da Bruker. As amostras secas de quitosana e quitosana/nanopartículas de cloreto de prata foram masseradas até que formassem um pó fino e analisadas nos ângulos entre 10° e 90° a pressão e temperatura ambiente. A análise do

difratograma obtido foi realizada utilizando o database do aparelho D 8 DISCOVER, da Bruker, com o site RRUFF – *Database of Raman Spectroscopy, X-ray diffraction and chemistry of minerals* e com o arquivo padrão de nanopartículas de cloreto de prata, publicado pelo *Joint Committee on Powder Diffraction Standards* (JCPDS arquivo n° 85-1355).

4.1.7 Energia dispersiva de raios X (EDX) e MEV

As amostras de quitosana e quitosana agregada com nanopartículas de prata foram metalizadas no aparelho Shimadzu IC-50 e então analisadas por MEV e EDS no aparelho Superscan SSX-550 SEM-EDX também da Shimadzu. No caso das membranas, somente o MEV foi realizado. Todas as imagens de MEV obtidas foram feitas com uma aceleração do feixe igual a 8,00 kV, exceto no caso das imagens realizadas para realizar o foco do EDX, no qual foi utilizado uma aceleração de 25,0 kV, energia necessária para garantir que todos os elementos gerassem devidamente seus raios X característicos.

4.1.8 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para a análise de microscopia eletrônica de transmissão, as amostras de quitosana e quitosana agregada com nanopartículas de cloreto de prata foram adicionadas em um eppendorf contendo água destilada e vigorosamente agitadas por cerca de 10 minutos. Cerca de um 1 mL do sobrenadante foi então recolhido, uma gota foi depositada em cima de um suporte circular de cobre revestido com carbono para secagem. Após secagem a temperatura ambiente, o suporte de cobre foi colocado no aparelho JEM 2100 da JEOL localizado no Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins (LUCCAR).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA

Os resultados da caracterização da Quitosana purificada como descrita na seção 4.1.1 por espectroscopia na região do Infravermelho (Figura 16) mostraram bandas de estiramento axial de OH (entre 3200 a 3400 cm^{-1}), que apareceu sobreposta à banda de estiramento N-H; deformação angular de N-H (em torno de 1550 cm^{-1}) provavelmente sobrepondo a deformação axial de C=O de amida e deformação axial de -CN de grupos amino (1400 cm^{-1}), além de bandas de estruturas de polissacarídeos na região de 890-1156 cm^{-1} em boa concordância com os dados da literatura [76,77,78].

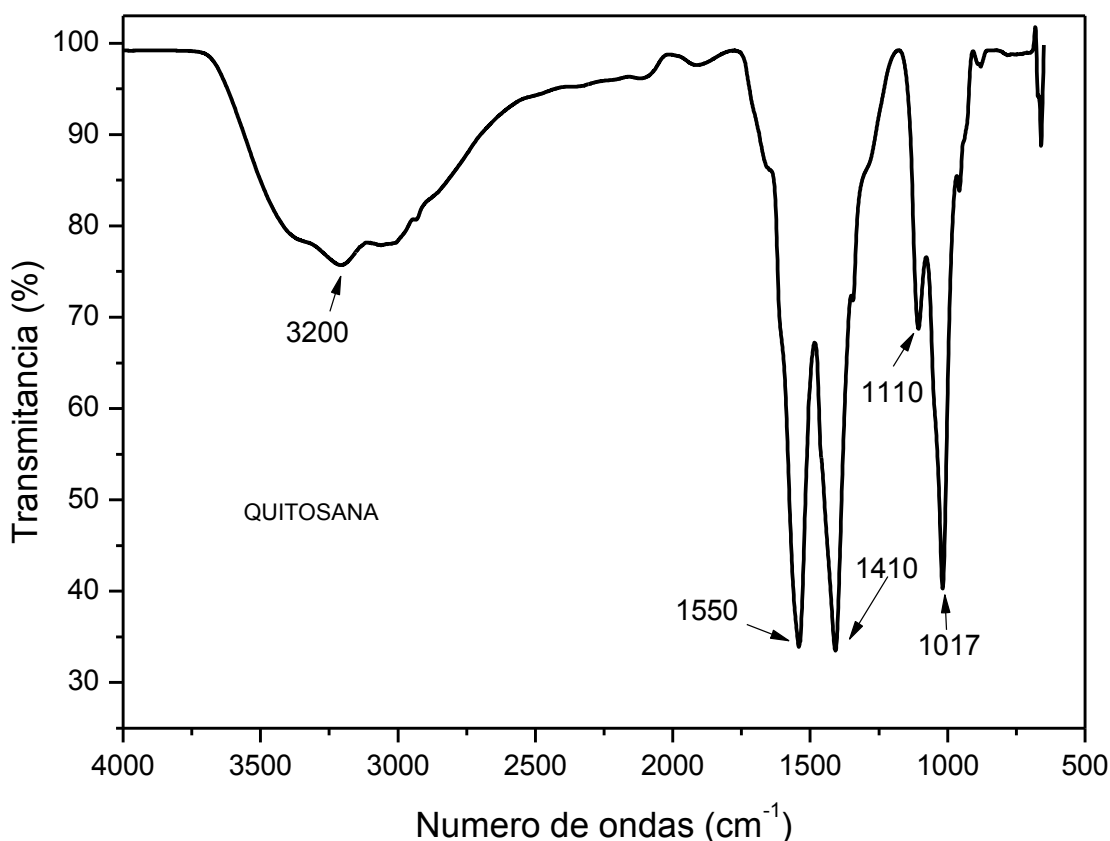


Figura 16: Espectros de infravermelho da quitosana purificada

Assim, as bandas médias em torno de 1100 cm^{-1} podem ser associadas ao estiramento C-O-C da ligação cíclica do anel e entre os anéis do polímero como descrito no estudo de Nelson (2015) [77].

Já o padrão de difração de raios X da quitosana (Figura 17) forneceu informações sobre a estruturas cristalinas da matéria prima remanescentes na matriz polimérica, uma vez que a quitosana é uma estrutura amorfa e não apresenta ficha cristalográfica.

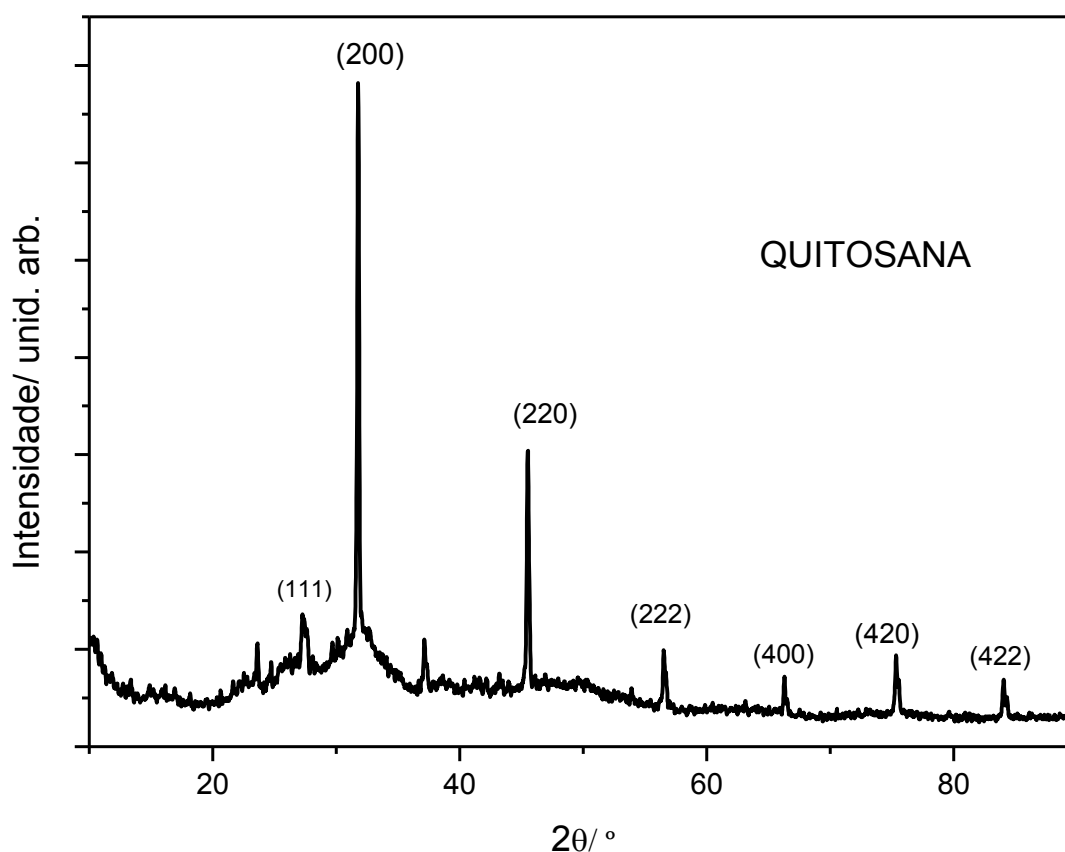


Figura 17: Padrão de difração de raios X da quitosana

No entanto, o padrão de difração de raio X da quitosana apresentou os picos em $27,40^\circ$, $31,75^\circ$, $45,47^\circ$, $56,49^\circ$, $66,24^\circ$, $75,31^\circ$ e 84° correspondente aos planos (111), (200), (220), (222), (400), (420), (422) respectivamente do cloreto de sódio, de acordo com o database do aparelho D8 DISCOVER, da Bruker, juntamente com

dados disponíveis no site RUFF [79] (*Database of Raman Spectroscopy, X-ray diffraction and chemistry of minerals*). A presença do cloreto de sódio foi confirmada no EDX da quitosana (Figuras 18 - 21).

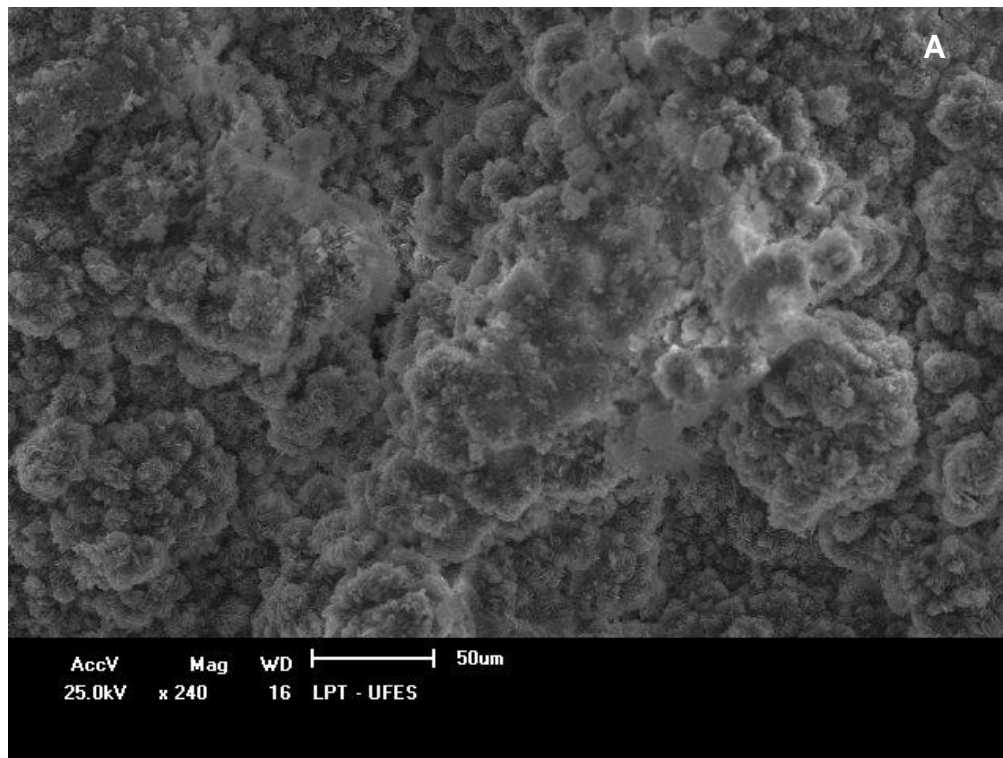


Figura 18: Micrografias obtidas por MEV da quitosana com ampliação de 240x , escala 50 µm

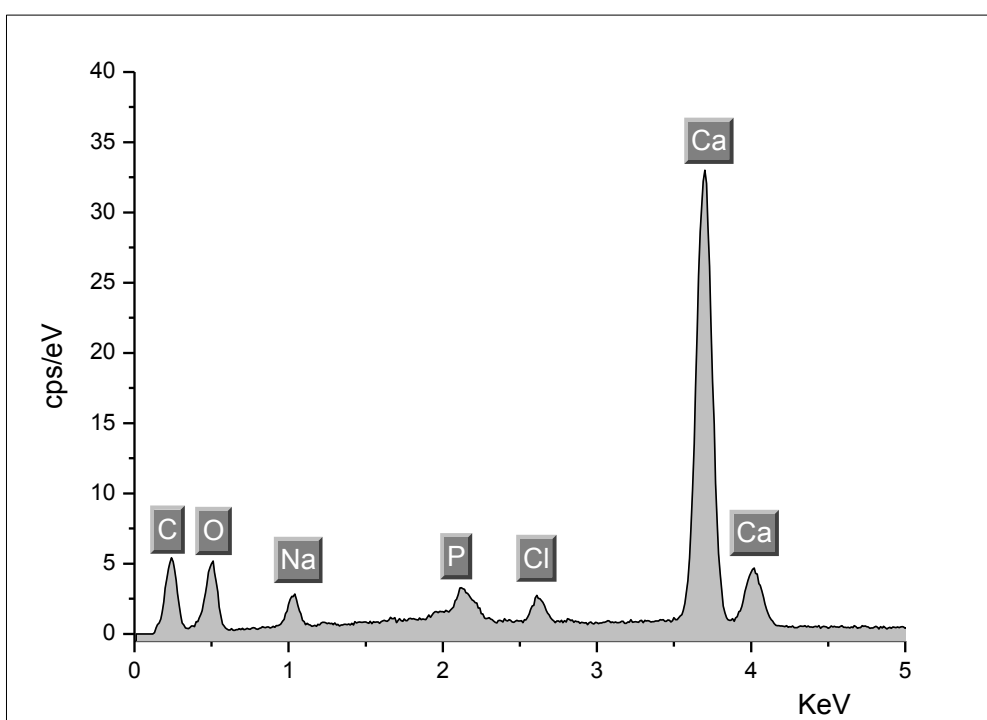


Figura 19: Espectros de EDX da (região A) da quitosana

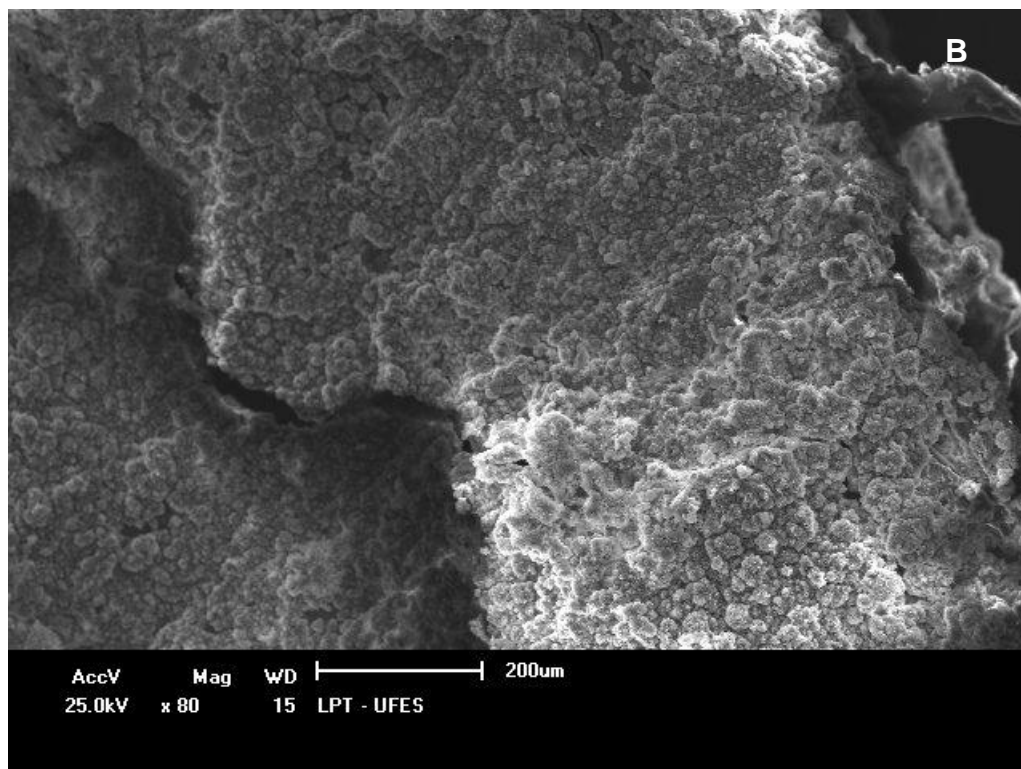


Figura 20: Micrografias obtidas por MEV da quitosana com ampliação de 80x, escala 200 μm.

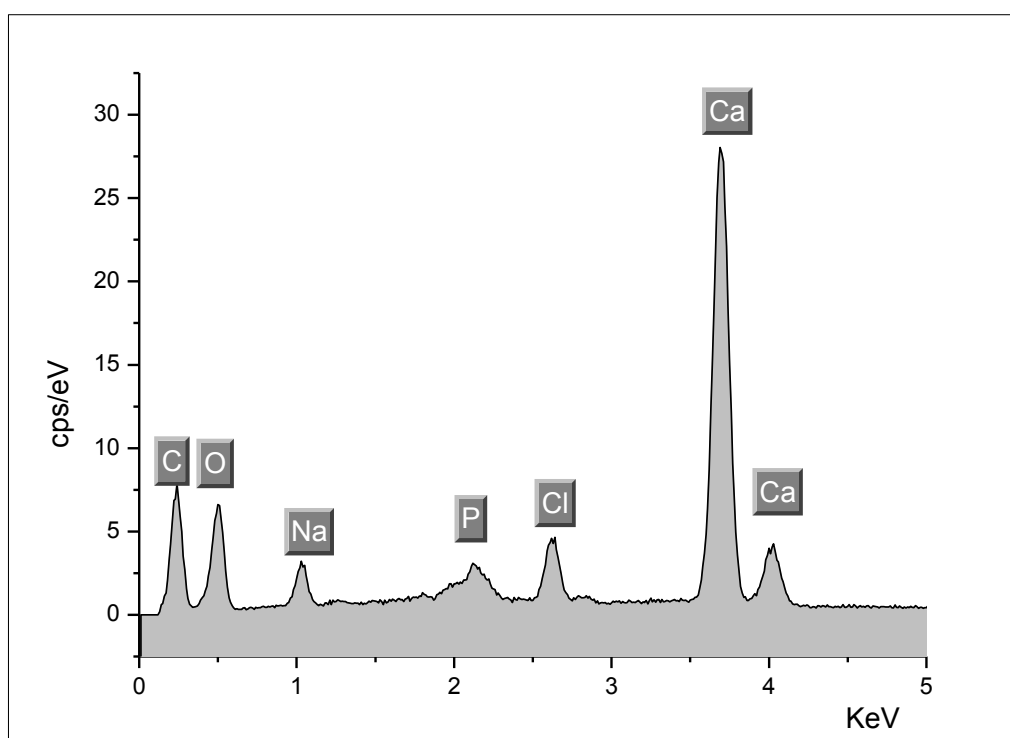


Figura 21: Espectros de EDX da (região B) da quitosana.

Após a análise dos espectros de EDX foi observado que a quitosana ainda apresentava em sua composição minerais proveniente da quitina *in natura* da qual foi obtida, esses minérios foram remanescentes do processo de desmineralização incompleta durante o processo de sua síntese. A análise dos espectros de EDX das duas regiões apresentaram composições semelhantes como pode ser observado anteriormente. (Figuras 19 e 21).

Os padrões de DRX obtidos da quitosana são condizentes com os espectros de EDX uma vez que o padrão de raios X apontou a presença de cloreto de sódio e o espectro de EDX constatou a presença dos elementos cloro e sódio adjunto a matriz polimérica.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA

A espectroscopia na região do Infravermelho dos diferentes materiais, quitosana e quitosana/nanopartículas de prata (Figura 22) foram observados aumentos dos picos em 1540 cm^{-1} e 1400 cm^{-1} , que são correspondente a deformação angular de N-H [80], sugerindo assim, uma provável interação das nanopartículas de prata com a quitosana [81].

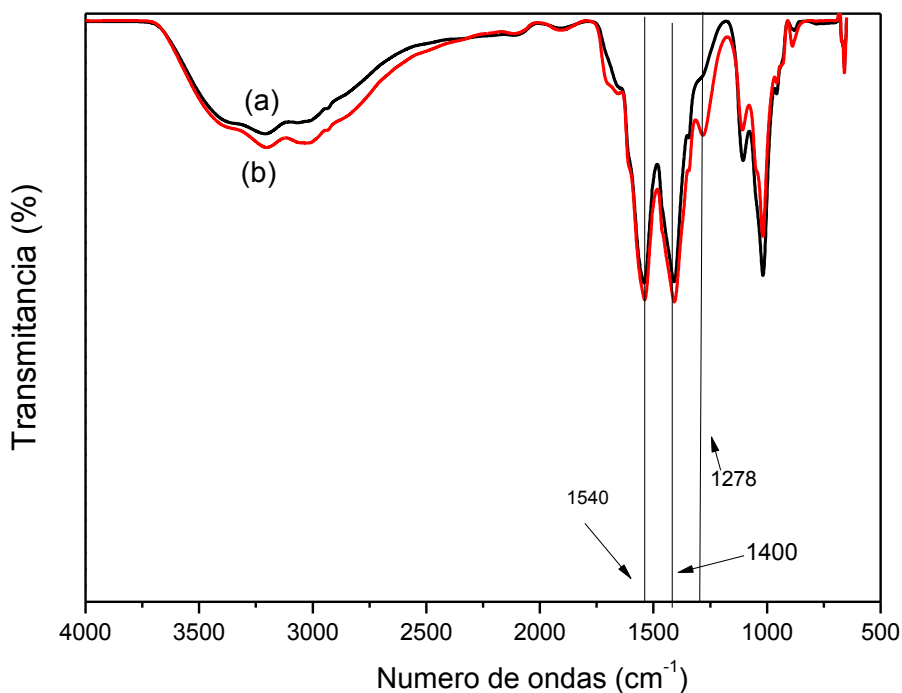


Figura 22: Espectros de infravermelho: (a) quitosana; (b) quitosana-nanopartículas de cloreto de prata.

O aumento do pico em 1270 cm^{-1} foi atribuído a interação íon-dipolo das nanopartículas a quitosana e/ou a capacidade de complexação com íons metálicos da quitosana, pois nessa região é característico da absorção da banda C-N, que normalmente são bandas de intensidade média a fraca, essa mesma observação foi relatada no trabalho de Edison, *et al.*[81], observa-se também alteração nos picos das regiões de bandas estruturais de polissacarídeos ($890\text{-}1156\text{ cm}^{-1}$) da quitosana/nanopartículas de prata em comparação a quitosana.

Os difratograma de raios X obtidos das nanopartículas de cloreto de prata (AgCl_{NP}) (Figura 23) foram analisadas com arquivo padrão de nanopartículas de cloreto de prata, publicado pelo *Joint Committee on Powder Diffraction Standards* (JCPDS arquivo n° 85-1355), e comparadas ao estudo de Gopinath *et al.* (2013) onde também foi relatado a síntese de nanopartículas de cloreto de prata, porém usando o extrato foliar de *Cissus quadrangularis* [60].

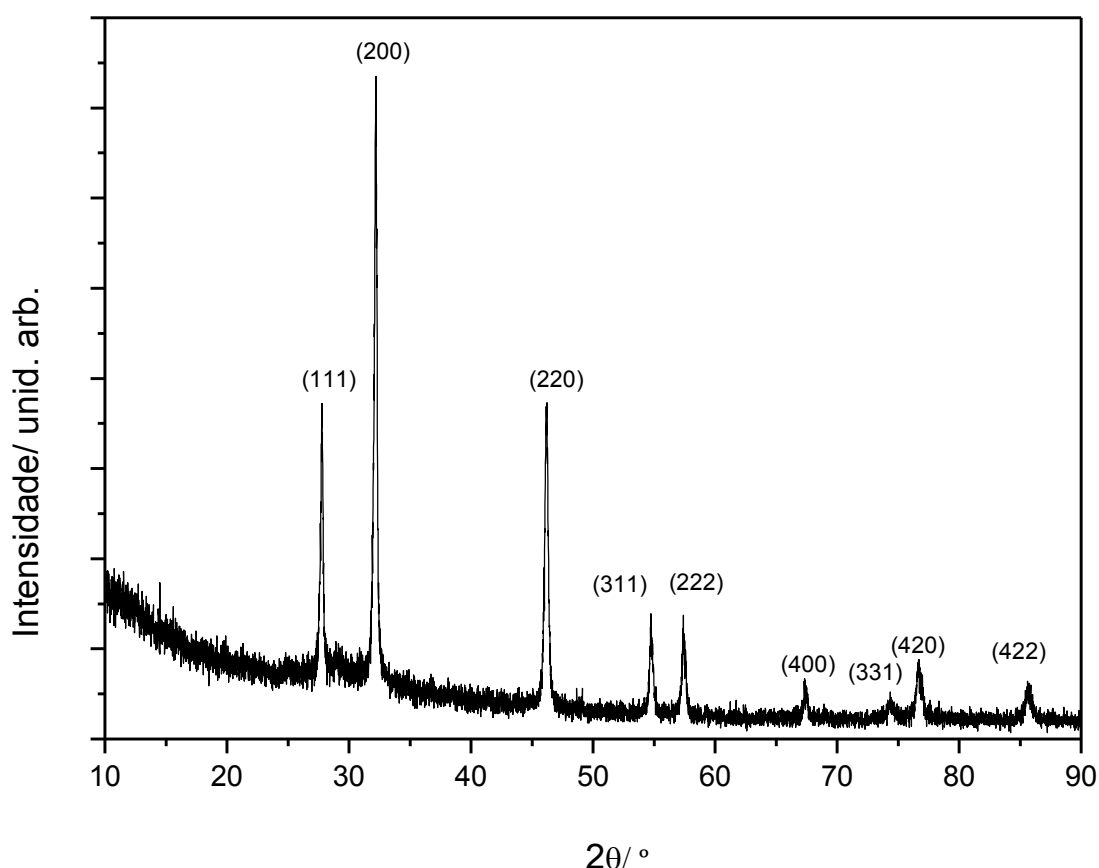


Figura 23: Padrão de difração de raios X da nanopartículas de cloreto de prata sintetizadas agregadas a matriz polimérica da quitosana

Os picos observados em $27,8^\circ$, $32,3^\circ$, $46,2^\circ$, $54,8^\circ$, $57,5^\circ$, $67,5^\circ$, $74,4^\circ$, $76,7^\circ$ e $85,6^\circ$ correspondente aos planos (111), (200), (220), (311), (222), (400), (331), (420) e (422), respectivamente.

Após a análise dos espectros de EDX (Figura 25) do precipitado de $\text{AgCl}_{\text{NP-QUI}}$ foi comprovado os elementos prata e cloro, confirmando assim como no difratograma de raios X (Figura 24) a presença do cloreto de prata. A presença de carbono e o oxigênio confirmam a presença da matriz da quitosana sugerindo assim que o polímero aderiu ao precipitado das AgCl_{NP} reforçando as conclusões obtidas da análise do FTIR da quitosana-nanopartículas de cloreto de prata (Figura 22).

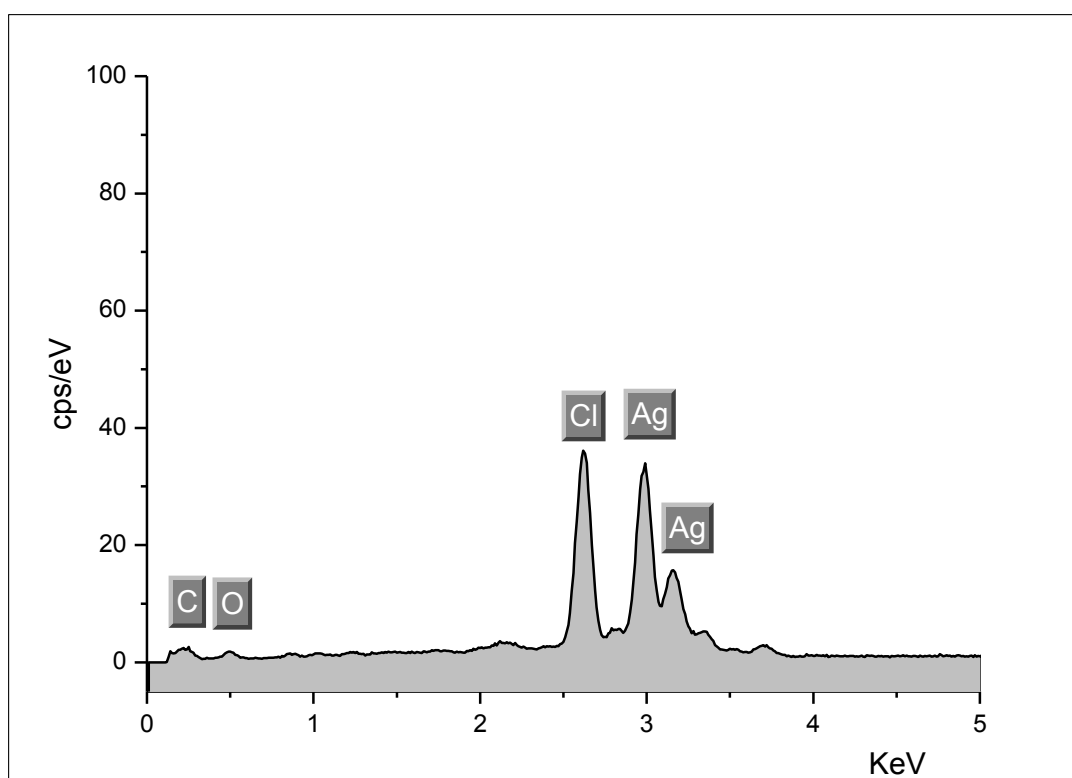


Figura 24: Espectros de EDX do precipitado da síntese das nanopartículas de cloreto de prata - quitosana.

O resultados de EDX foi semelhante aos obtidos por Parveen e colabs. (2016)[82] que relataram a síntese de Nanopartículas de prata utilizando extrato de *Fraxinus excelsior* onde também concluíram que os picos fracos de C e O são originados das biomoléculas, mesma conclusão relatada no trabalho de Ravichandran e colabs. (2016)[83].

Já Kim e colabs.[84] concluíram que o pico de absorção em 3 keV, também observados na Figura 24, são picos característicos de nanopartículas de prata, resultado semelhante foi obtido por Geethalakshmi e colabs. (2012)[85].

A microscopia eletrônica de transmissão foi utilizada para fornecer mais informações sobre o tamanho, a forma e a morfologia das nanopartículas de prata sintetizadas agregadas a matriz polimérica da quitosana, essas micrografias (Figura 25) foram tratadas com o software imageJ® para a obtenção do tamanho médio das partículas.

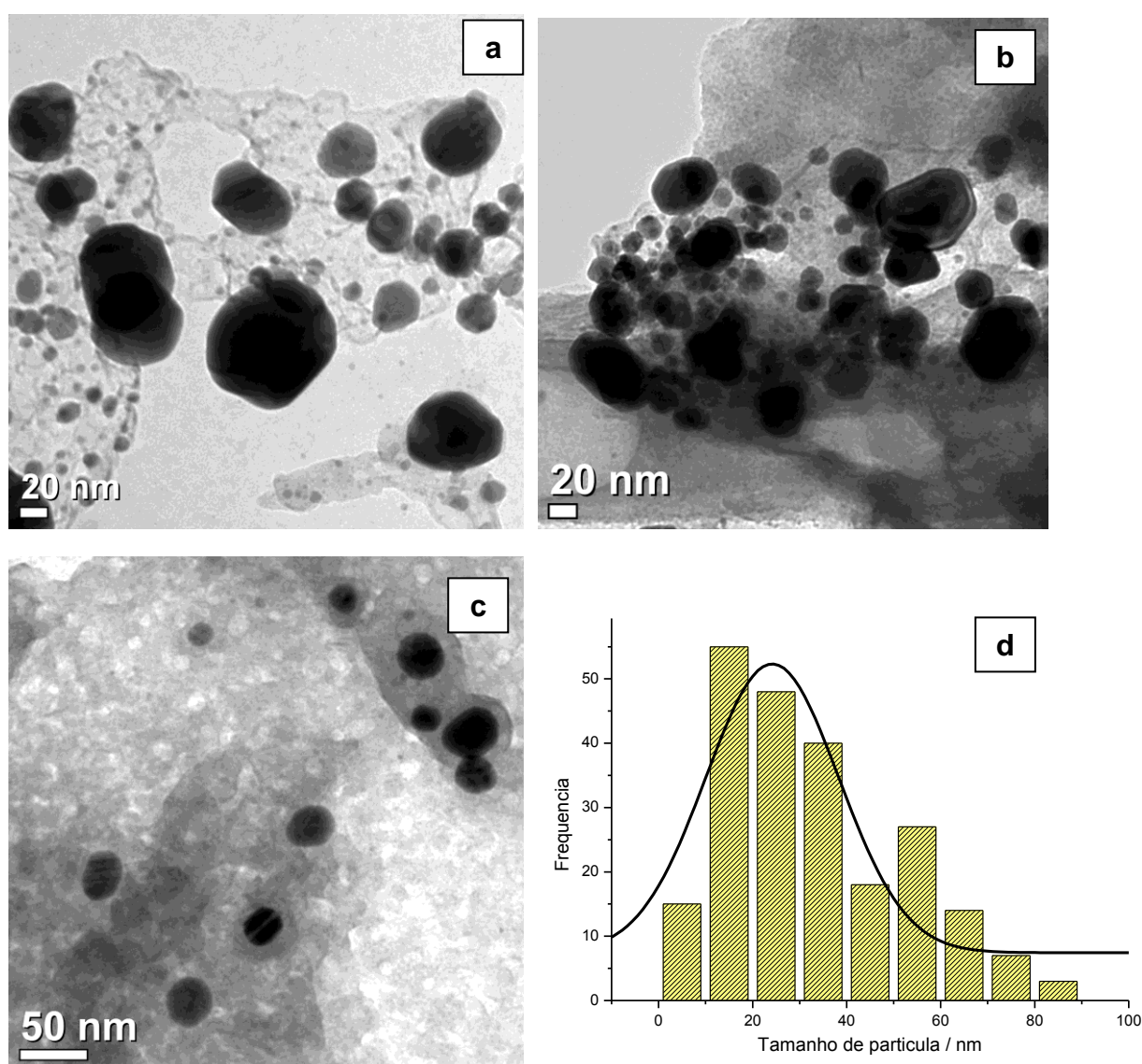


Figura 25: Micrografia de MET das nanopartículas aderidas a quitosana: (a) escala de 20 nm, (b) escala de 20 nm, (c) escala de 30 nm e (d) histograma do tamanho médio das nanopartículas de cloreto de prata estimada pelo software imageJ.

As imagens de MET revelaram que as nanopartículas de prata sintetizadas formadas eram predominantemente esféricas, polidispersas e com diâmetros na faixa de 15-35 nm, pode também observar que as nanopartículas de prata estão cercadas por uma fina camada de outro material, que acredita-se ser de material orgânico do polímero, já que os elementos que o compõem também foram detectados no EDX.

Estes materiais orgânicos limitantes impedem a agregação das nanopartículas de prata e, assim, proporcionam uma estabilidade adicional para as mesmas, essa mesma observação foi relatada no trabalho de Parveen e colabs. (2016) [82].

Micrografias semelhantes a da Figura 25 foram obtidas por Kim e colabs (2015)[84] que sintetizaram nanopartículas de prata e ouro a partir de extrato de ginseng e por Shen e colabs. (2007) [86] que obtiveram AgCl_{NP} por microemulsão.

O tamanho médio das nanopartículas obtidas agregadas a matriz de quitosana foi de 25 nm, o tamanho das nanopartículas é um importante fator já que os íons de prata ao atravessar a membrana do microorganismo têm a capacidade de inibir a multiplicação bacteriana, pela ligação e desnaturação do DNA, afetando subunidade ribossomal e algumas enzimas importantes para o crescimento das células bacterianas daí a eficiência desse processo é dependente do tamanho dessas nanopartículas como relatado na literatura.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA – COLÁGENO

A análise de FTIR do colágeno (Figura 26) apresentou as bandas características de amida I, II e III em 1650, 1560 e 1235 cm⁻¹ [87] respectivamente, que também são bandas composta por absorções decorrentes de vibrações de grupos CH₂ do esqueleto de glicina e cadeias laterais de prolina [88]. Adicionalmente, foram observadas bandas de 3270, 2920 e 1430 cm⁻¹, que representam o alongamento de anéis -OH, -CH₃ e pirrolidina, respectivamente [88].

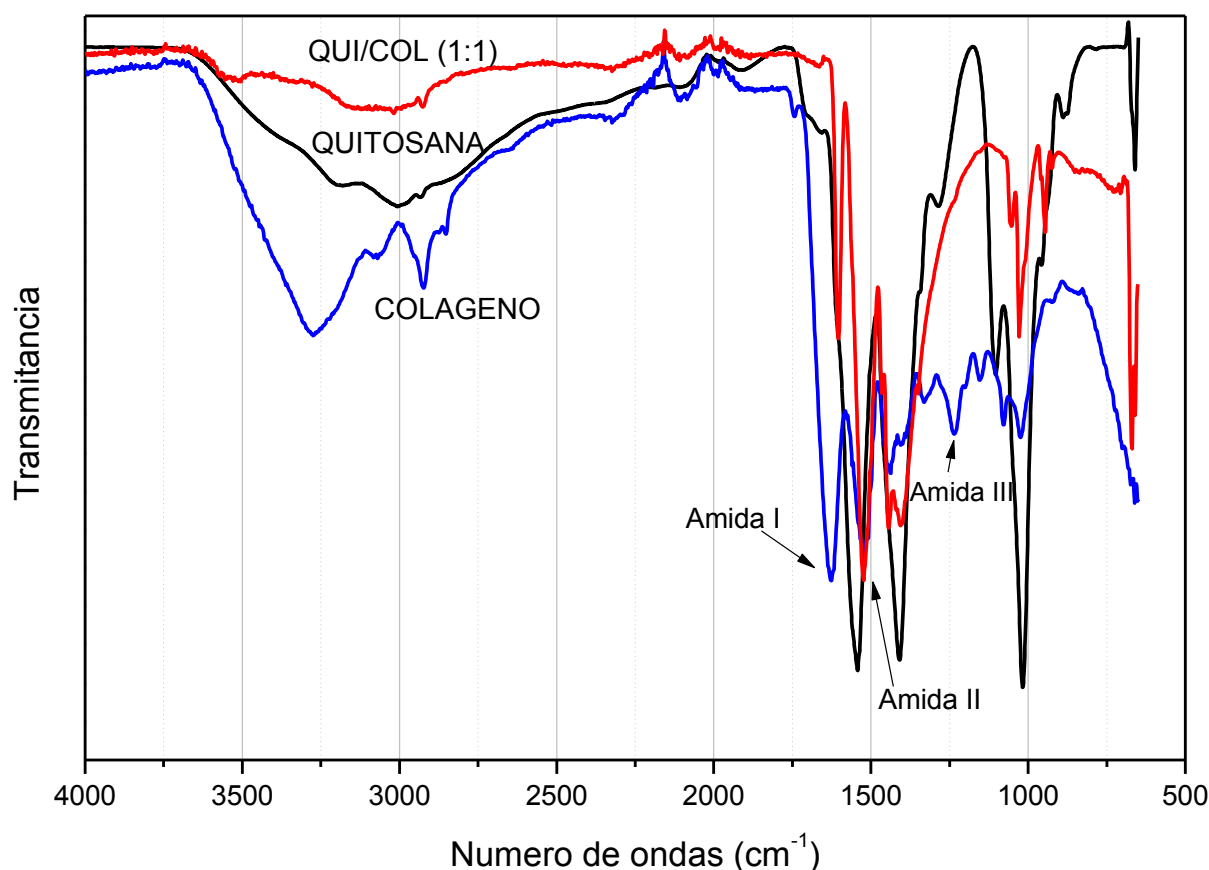


Figura 26: Espectros de infravermelho da quitosana, quitosana - colágeno (1:1) e colágeno.

As interações entre o colágeno e quitosana podem ocorrer pela formação de ligações de hidrogênio. Os grupos $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$ e $-\text{C}=\text{O}$ no colágeno são capazes de formar ligações de hidrogênio com $-\text{OH}$ e $-\text{NH}_2$ presentes na quitosana [88]. E como relatado no estudo feito por Fernandes, *et al.* (2011)[88] em meio ligeiramente ácido ocorre protonção dos grupos amino da quitosana o que favorece a atração eletrostática com grupos $-\text{COO}^-$ de resíduos do ácido aspártico e glutâmico do colágeno [88].

Os espectros FTIR das blendas em diferentes proporções de quitosana e colágeno são observados na Figura 27, onde não foram identificadas bandas adicionais. Como já identificado anteriormente em outros trabalhos, ocorre aumento da banda correspondente a amida I e diminuição de amida II à medida que a proporção de colágeno aumenta.

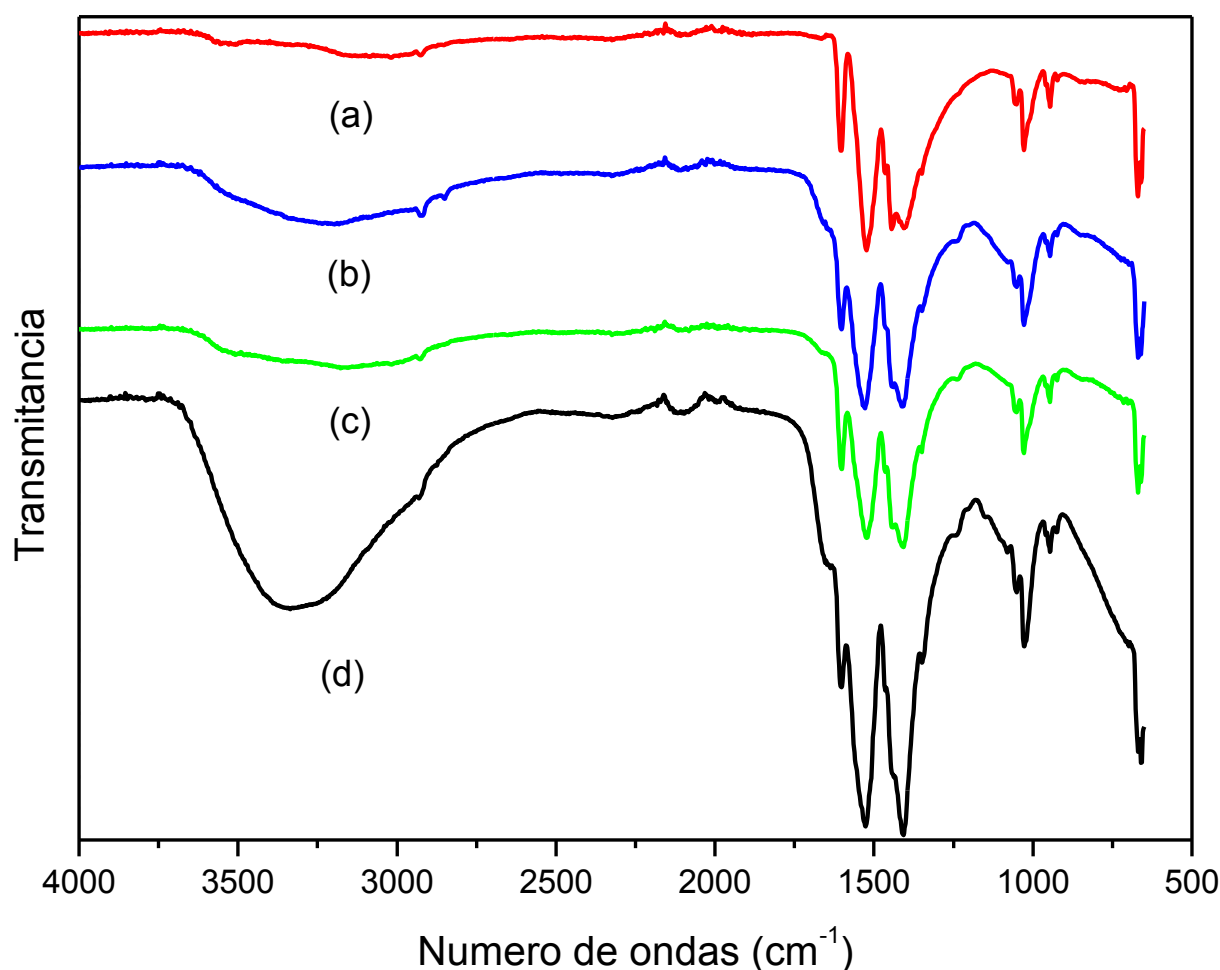


Figura 27: Espectros de infravermelho das membranas quitosana - colágeno: (a)1:1; (b) 1:2; (c) 1:3 e (d) 3:1

A integridade da hélice tripla do colágeno pode ser avaliada pela razão entre a absorvância em 1235 e a 1450 cm^{-1} [88], característica importante pois, essa característica tridimensional do colágeno é que lhe confere propriedades biológicas e mecânicas.

Os valores de razão para o colagénio desnaturado são de cerca de 0,5 e os de estruturas intactas são de cerca de 1. Para as amostras na proporção quitosana/colágeno 1:1, 1: 2 e 1:3 as razões obtidas foram acima de 1 , porém para a proporção 3:1 o valor obtido foi 0,46 o que é indicativo que o aumento da quantidade de quitosana em relação ao colágeno desestabiliza a tripla hélice da estrutura protéica do colágeno. No aspecto macroscópico das membranas, foi observado que a maleabilidade das membrans vai diminuindo com o aumento da proporção de quitosana (Figura 29).

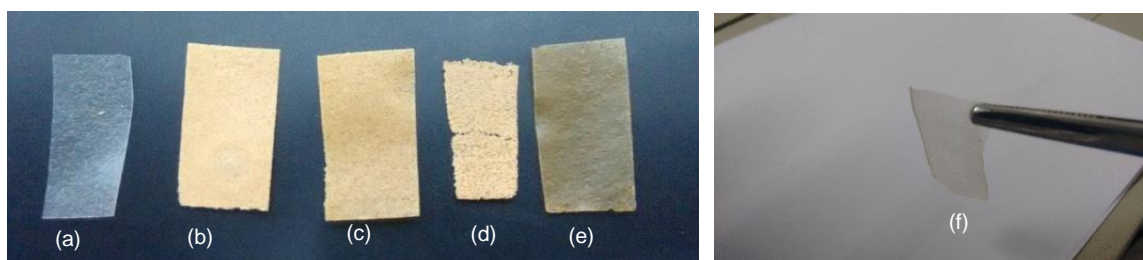
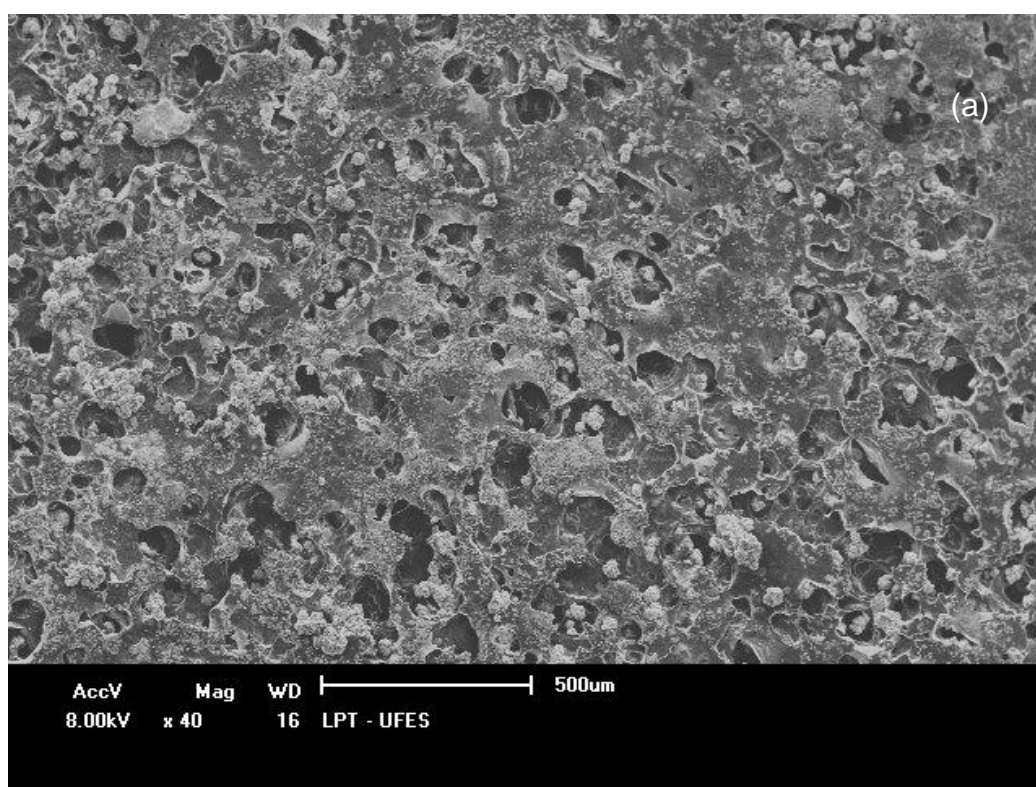
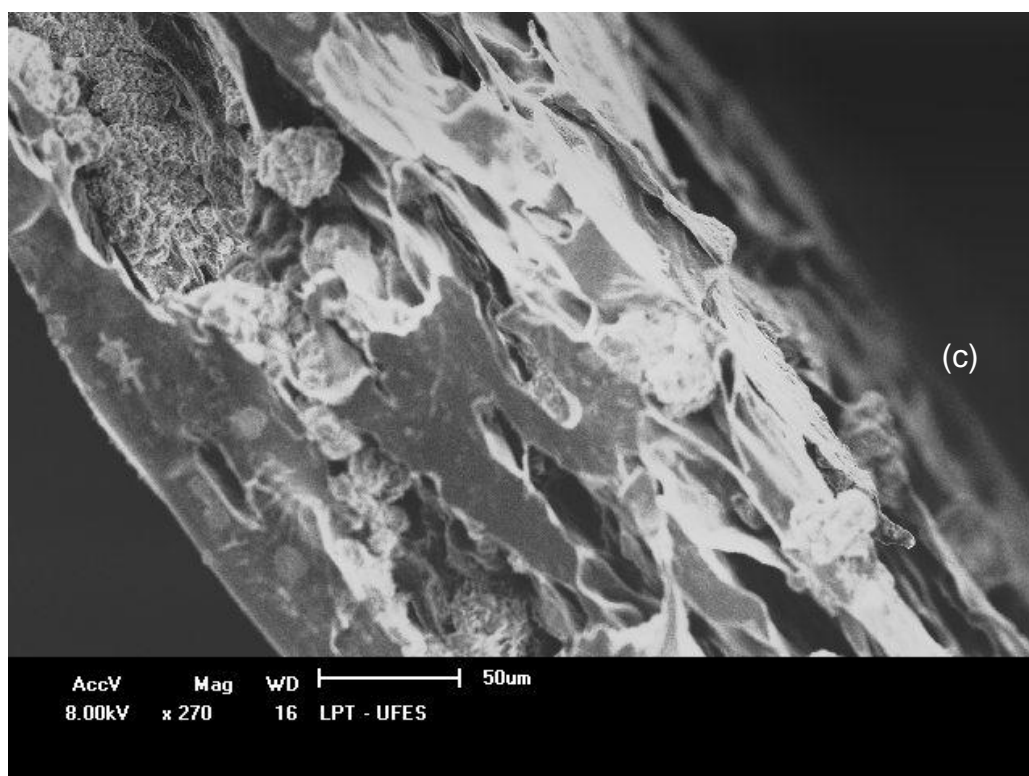
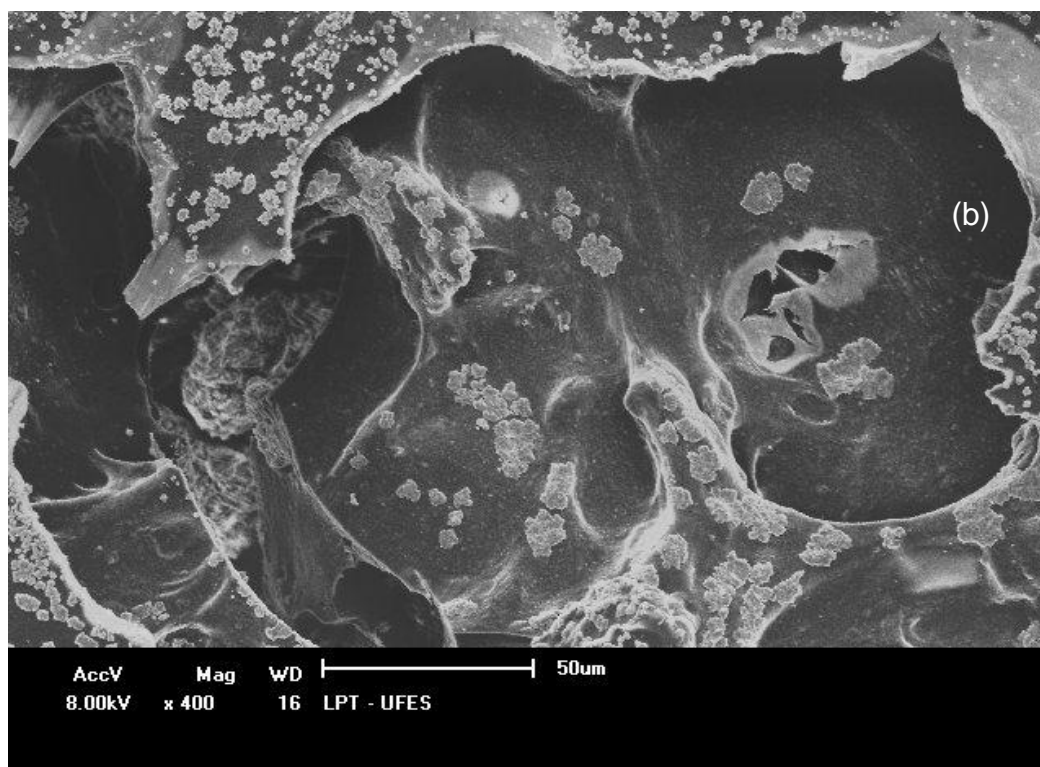


Figura 28: Imagens das membranas: (a) colágeno; (b) quitosana - colágeno (1:1) ; (c) quitosana - colágeno (1:2) ; (d) quitosana - colágeno (3:1) ; (e) quitosana - colágeno (1:3) e (f) vista lateral da membrana de quitosana - colágeno (1:1)

Na análise micrográfica do MEV da blenda quitosana - colágeno mostrou uma estrutura porosa (Figura 29), como poros abertos e com auto grau de interconectividade entre as fases da blenda.





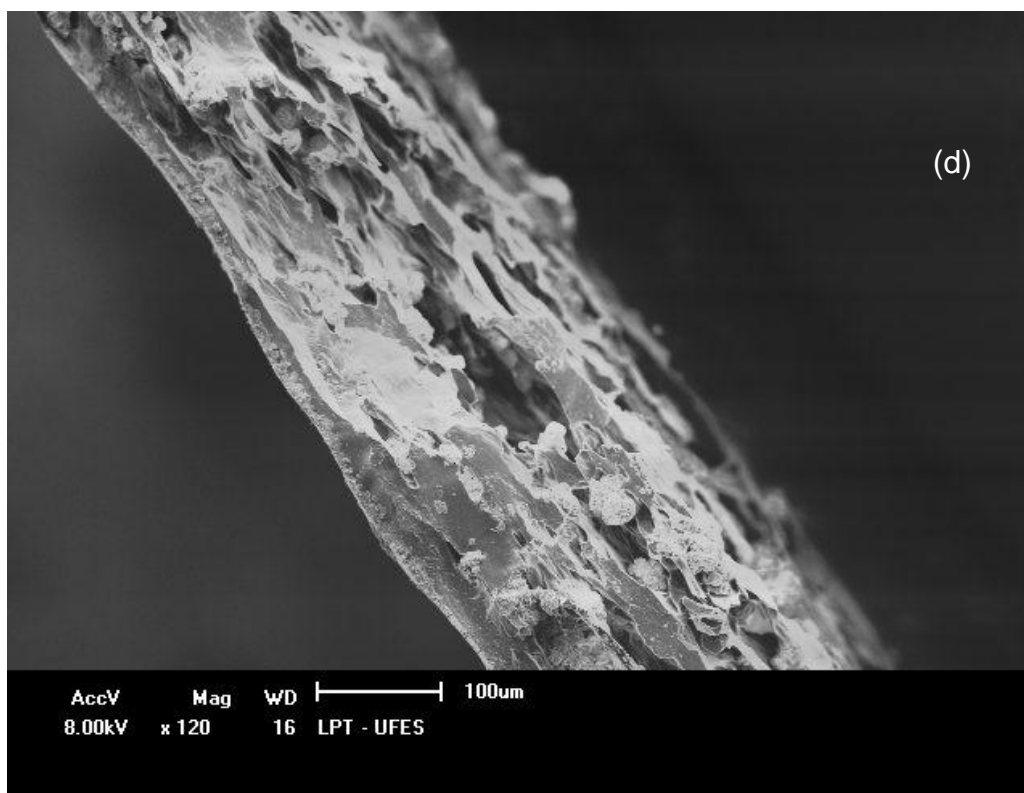


Figura 29: Micrografias de MEV da membranas (1:1) : (a) quitosana - colágeno 50x; (b) quitosana - colágeno 400x; (c) visão lateral quitosana - colágeno 120x; e (d) visão lateral quitosana - colágeno 270x.

Biomateriais no forma de *scaffolds* são aqueles que possuem arcabouço tridimensional poroso, propriedades bioativas e biodegradáveis, que servem de molde para a formação do novo tecido [89]. Eles mimetizam os meios físicos e químicos do tecido saudável, para guiar a migração, diferenciação e proliferação tecidual [90]. Logo, a topografia observada na Figura 30 das membranas sintetizadas compostas por quitosana e colágeno apresentaram tais características que são essenciais e indispensáveis para que as mesmas possam ser empregadas como biomaterial.

6 CONCLUSÕES

Usando o método de evaporação do solvente das soluções poliméricas foram produzidos com sucesso blendas de quitosana-colágeno com estruturas porosas e interconectadas confirmadas no MEV e compatíveis com outros métodos empregados na literatura.

A proporção quitosana-colágeno é importante para a manutenção da estrutura do colágeno uma vez na proporção 3:1 (QUI-COL) foi observado uma possível desnaturação proteica do colágeno e com isso perdendo provalvemente suas propriedades como biomaterial. O FTIR confirmou regiões tanto na quitosana quanto no colágeno responsáveis pela interação intermolecular entre os polímeros que os tornam compatíveis para o emprego futuro na medicina regenerativa.

As nanopartículas de cloreto de prata foram sintetizadas e caracterizadas por raios X onde pode observar os picos característicos das nanopartículas, já o EDX reafirmou a presença dos elementos Ag e Cl, no entanto pode-se observar que as mesmas estavam agregadas a matriz polimérica da quitosana pois os picos referentes a carbono e oxigênio originados da matriz orgânica estavam presentes, essa mesma conclusão foi fundamentada pelo MET podendo constatar a presença de matéria orgânica envolvendo as nanopartícula, essa característica de agregação coferem as nanopartículas mais estabilidade pois a matriz orgânica impede sua agregação.

As membranas de quitosana - colágeno carregadas com nanopartículas de cloreto prata sintetizadas aparecem como alternativa para serem aplicadas como biomaterial para auxiliar no processo de cicatrização da pele já que apresentaram estruturas tridimensionais que facilitariam a proliferação celular além de serem formadas por materiais biocompatíveis e biodegradáveis.

7 TRABALHOS FUTUROS

- Aumentar o grau de desmineralização e acetilação da quitosana produzida segundo a patente PI11064145.
- Quantificar e otimizar a síntese das AgCl_{NP} agregadas a quitosana.
- Testar a eficiência e a concentração mínima das AgCl_{NP} para ação bactericida.
- Testar diferentes métodos de esterilização das membranas quitosana-colágeno - AgCl_{NP} obtidas, visto manter a integridade da matriz polimérica.
- Avaliar *in vitro* e *in vivo* a ação regenerativa e bactericida das membranas buscando a composição ideal da razão quitosana/ colágeno/ AgCl_{NP}.
- Testar as membranas de quitosana-colágeno carregadas com nanopartículas de cloreto de prata *in vitro* e *in vivo*.
- Sintetizar nanofibras de quitosana-colágeno carregadas com nanopartículas de cloreto de prata para aplicação medicinal.

8 REFERÊNCIAS

1. JUNQUEIRA, L.C.U. & CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11^a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 524p
2. ZAFFAGNINI, S. , et al.; **Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy: official journal of the ESSKA 2007** , 15 , 175 .
3. SIONKOWSKA, A.; KOZLOWSKA, J. **Properties and modification of porous 3-D collagen/hydroxyapatite composites**, Int. J. Biol. Macromol. 52 (2013) 250–259.
4. SIONKOWSKA, A. ,PLANECKA , A.. **Preparation and characterization of silk fibroin/chitosan composite sponges for tissue engineering**, J. Mol. Liq. 178 (2013) 5–14.
5. Q. Lv ; FENG Q.;HU, K.; CUI , F.. **Three-dimensional fibroin/collagen scaffolds derived from aqueous solution and the use for HepG2 culture**, Polymer 46 (2005) 12662–12669.
6. MORAES, M.A. de; SILVA , M.F.; WESKA, R.F.; BEPPU, M.M.. **Silk fibroin and sodium alginate blend: miscibility and physical characteristics**, J. Mater. Sci. Eng. C 40 (2014) 85–91.
7. LI, J.; BARROW, D.;HOWELL, H.; KALACHANDRA, S..**In vitro drug release study of methacrylate polymer blend system: effect of polymer blend composition, drug loading and solubilizing surfactants on drug release**, J. Mater. Sci. Mater. Med. 21 (2010) 583–588.
8. JETBUMPENKUL, P.; AMORNSUDTHIWAT, P.; KANOKPANONT, S.; DAMRONGSAKKUL, S.. **Balanced electrostatic blending approach – An alternative to chemical crosslinking of Thai silk fibroin/gelatin scaffold**, Int. J. Biol. Macromol. 50 (2012) 7–13.
9. SIONKOWSKA ,A., **Current research on the blends of natural and synthetic polymers: review”**, Prog. Polym. Sci. 36 (2011) 1254–1276.
10. BADAWY, MOHAMED E. I., RABEA, ENTAR I. **A biopolymer chitosan and Its derivatives as promising antimicrobial agents against plant pathogens and their applications in crop protection**, International Journal of Carbohydrate Chemistry, 2011.
11. SIONKOWSKA, A.; WISNIEWSKI, M.; SKOPINSKA, J. G. F.; POGG, G. F.; MARSANO, I. E.; MAXWELL, C. A.; WESS, T. J. **Thermal and mechanical properties of UV irradiated collagen/chitosan thin films**. Polymer Degradation and Stability.v.91, n. 12, p. 3026-3032, 2006.
12. ALBUQUERQUE-JUNIOR, R. L. C.; BARRETO, A. L. S.; PIRES, J. A.; REIS, F. P.; LIMA, S. O.; RIBEIRO, M. A. G. **Effect of Bovine Type-I Collagen-Based Films Containing Red Propolis on Dermal Wound Healing in Rodent Model**. Int. J. Morphol, v. 27, n. 4, p. 1105-1110, 2009.
13. RIELLA, K. R.; MARINHO, R. R.; SANTOS, J.S.; PEREIRA-FILHO, R. N.; CARDOSO, J. C.; ALBUQUERQUE-JUNIOR, R. L. C.; THOMAZZI, S. M. **Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippiagraxis*, in rodents**. Journal of Ethnopharmacology.v. 143, n. 2, p. 656-663, 2012.
14. ANTUNES B.P.; MOREIRA A.F., GASPAR, V.M.; CORREIA, I.J. . **Chitosan/arginine–chitosan polymer blends for assembly of nanofibrous membranes for wound regeneration**. Carbohydrate Polymers 130 (2015) 104–112.

15. SIONKOWSKA, Alina; KACZMAREK, Beata; LEWANDOWSKA, Katarzyna; GRABSKA, Sylwia; POKRYWCZYNSKA, Marta; KLOSKOWSKI, Tomasz; DREWA, Tomasz. **3D composites based on the blends of chitosan and collagen with the addition of hyaluronic acid.** International Journal of Biological Macromolecules 89 (2016) 442–448
16. Disponível em: <www.scopus.com> . Acesso em 13 de set. 2016.
17. FONG, Joy; WOOD, Fiona. **Nanocrystalline silver dressings in wound management: a review.** International Journal of Nanomedicine, v. 1, n. 4, p. 441, 2006.
18. NADWORNYY, Patricia L. et al. **Anti-inflammatory activity of nanocrystalline silver in a porcine contact dermatitis model.** Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine, v. 4, n. 3, p. 241-251, 2008.
19. HUANG, Yuesheng et al. **A randomized comparative trial between Acticoat and SD-Ag in the treatment of residual burn wounds, including safety analysis.** Burns, v. 33, n. 2, p. 161-166, 2007.
20. GE, Liangpeng ,et al. **Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity.** International Journal of Nanomedicine (2014)
21. PIRES, Ana Luiza R.; BIERHALZ, Andréa C. K.; MORAES, Ângela M. **Biomateriais: tipos, aplicações e mercado.** Química Nova, 2015.
22. HEATH, D. E.; COOPER, S. L.; **Em Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine.** Ratner, B. D.; Hoffman, A. S.; Schoen, F. J.; Lemons, J. E., eds.; Academic Press: Oxford, 2013, cap. 1.2.2. Polymers: Basic Principles
23. WONG, J. Y.; BRONZINO, J. D.; Biomaterials, Taylor & Francis Group: New York, 2007.
24. ANGELOVA, N.; HUNKELER, D.; Trends Biotechnol. **1999**, 17, 409.
25. PARK, J.; LAKES, R.S. **Biomaterials: an introduction.** 3. ed. New York: Springer, 2010, 561p.
26. SHALABY, S. W.; BURG, K. J. L. **Absorbable and biodegradable polymers.** USA: Florida, 2004. 289p.
27. JONES, June E. ; NELSON, E. Andrea . **Skin grafting for venous leg ulcers.** Cochrane Database of Systematic Reviews , 2013.
28. WINTER, G.D.. **Formation of the scab and the rate of epithelization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig.** Nature, 1962.
29. EDWARDS, J.V.; et al. **Modified cotton gauze dressings that selectively absorb neutrophil elastase activity in solution.** Wound Repair Regen, 2001.
30. Kamoun, Elbadawy A.; Kenawy, El-Refaie S.. **A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings.** Journal of Advanced Research (2017) 8, 217–233.
31. CHUNG, K.C.; GLORI, A.K.. **Systematic review of skin graft donor-site dressings.** Plast Reconstr Surg. 2009;124(1):307-8.
32. ISAAC, C.; LADEIRA, P.R.S.; REGO, F.M.P.; ALDUNATE, J.C.B.; FERREIRA, M.C.. **Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica.** Rev Med. 2010;89(3/4): 125-31.
33. FERREIRA, M.C.; TUMA, P. Jr.; CARVALHO, V.F.; KAMAMOTO, F. **Feridas complexas.** Clinics. 2006;61(6):571-8.
34. LIMA, R.O.L; RABELO, E.R.; MOURA, V.M.B.D.; SILVA, L.A.F.; TRESVENZOL, L.M.F. **Cicatrização de feridas cutâneas e métodos de avaliação.** Revisão de literatura. Revista CFMV. 2012;56(2):53-9.

35. VINCENT, J.F.V.; WEGST, U.G.K., **Arthropod. Struct. Dev.** 46 (2000) 187–199.
36. ANDRADE, A.N. **Otimização do Processo de Obtenção da Quitina e Quitosanas do Exoesqueleto de Camarões oriundos da Indústria Pesqueira Paraibana**, João Pessoa-PB: Instituto de Química, Universidade Federal da Paraíba, 89 p., Tese (Doutorado), 2007.
37. MUZZARELLI, R.A.A.; JEUNIAUX, C.; GOODAY, G.W.. **Chitin in Nature and Technology**. Plenum, New York, 1986, pp. 385.
38. ROBERTS, G.A.F.. **Chitin Chemistry**, Macmillan Press, London, 1992, pp. 72.
39. DUMITRIU, S.. **Polysaccharides in Medicinal Application**, Marcel Dekker, New York, 1996.
40. MI, F. L.; SHYU, S. S.; WU, Y. B.; LEE, S. T.; SHYONG, J. Y.; HUANG, R. N. **Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing**, *Biomaterials* vol.22, p.165-173, 2001.
41. COSTA SILVA, H. S. R.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. **Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços**, *Química Nova*, vol. 29(4), p. 776-785, 2006.
42. ANITHA, A.; SOWMYA, S.; KUMAR, P. T. S.; DEEPTHI, S.; CHENNAZHI, K. P.; EHRLICH, H.; TSURKAN, M.; JAYAKUMAR, R., **Chitin and chitosan in selected biomedical applications**, *Progress in Polymer Science*, vol. 39, p.1644-1667, 2014.
43. LEE, D. W.; LIM, C.; ISRAELACHVILI, J. N.; HWANG, D. S., **Strong Adhesion and Cohesion of Chitosan in Aqueous Solutions**, *Langmuir*, vol. 29, p.14222–14229, 2013.
44. AHMED, Shakeel; IKRAM, Saiqa. **Chitosan Based Scaffolds and Their Applications in Wound Healing**. *Achievements in the Life Sciences - ALS - 00054* (2016).
45. RAFIQUE, Ammara; ZIA, Khalid Mahmood; ZUBER, Mohammad, TABASUM, Shazia; REHMAN, Saima. **Chitosan functionalized poly(vinyl alcohol) for prospects biomedical and industrial applications: A review**. *International Journal of Biological Macromolecules* 87 (2016) 141–154
46. CHEN, J. P.; KUO, C. Y.; LEE, WEE. L.; *Appl. Surf. Sci.* **2012**, 262, 95.
47. ÁVILA, A.; BIERBRAUER, K.; Pucci, G.; LÓPEZ-GONZÁLEZ, M.; STRUMIA, M.; *J. Food Eng.* **2012**, 109, 752.
48. DALLAN, P. R. M.; MOREIRA, P. L.; PETINARI, L.; MALMONGE, S. M.; BEPPU, M. M.; GENARI, S. C.; MORAES, A. M.; *J. Biomed. Mater. Res., Part B* **2007**, 80, 394.
49. LEE, B. C.; KIM, M. S.; CHOL, S. ;KIM, Y. K. ; KIM, T. S.. **In vitro and in vivo antimicrobial activity of water-soluble chitosan oligosaccharides against *Vibrio vulnificus*** . *J. Mol Med.* 2009.
50. COSTA, E. M.; SILVA, S.; PINA, C.; TAVARIA, F. K.; PINTADO, M. M. **Evaluation and insights into chitosan antimicrobial activity against anaerobic oral pathogens**. *Anaerobe*, 18, 305–309. (2012).

51. MARQUEZ, Galvan. *et al.* **Disruption of protein synthesis as antifungal mode of action by chitosan.** International Journal of Food Microbiology, 164, 108–112. (2013).
52. SILVA, H. S. R. C.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. **Quitosana: Derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços.** Química Nova. V. 29, n.04, 2006.
53. JETBUMPENKUL, P.; AMORNSUDTHIWAT, P.; KANOKPANONT, S.; DAMRONGSAKKUL, S.. **Balanced electrostatic blending approach – An alternative to chemical crosslinking of Thai silk fibroin/gelatin scaffold,** Int. J. Biol. Macromol. 50 (2012) 7–13.
54. DEMAN, JM. **Principles of food Chemistry.** Aspen: Maryland; 1999.
55. TORLEY, P.J.; D'ARCY, B.R.; TROUT, G.R. **The effect of ionic strenght, polyphosphates type, pH, cooking temperature and preblending on the functional properties of normal and pale, soft, exudative (PSE) pork.** Meat Sci 2000;55:451-62
56. WOLF, K. L. **Propriedades físico-químicas e mecânicas de biofilmes elaborados a partir de fibra e pó de colágeno.** Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2007.
57. FENG, Q. L.; WU, J.; CHEN, G. O.; CUI, F. Z.; KIM, T. N.; KIM, J. O.; *J. Biomed. Mater. Res., Part A* 2000, 52, 662.
58. WANG, P.; HUANG, B.; QIN, X.; ZHANG, X.; DAI, Y.; WEI, J.; WHANGBO, M. **Ag⁰ AgCl: A Highly Efficient and Stable Photocatalyst Active under Visible Light.** Angewandte Chemie International Edition, 47: 7931–7933. (2008).
59. ZHANG, Hui. *et al.* **Graphene Sheets Grafted Ag@AgCl Hybrid with Enhanced Plasmonic Photocatalytic Activity under Visible Light.** *Environmental Science & Technology* , 2011.
60. GOPINATH, V.; PRIYADARSHINI, S.; PRIYADHARSSHINI, N.M.; PANDIAN K.; VELUSAMY, P. **Biogenic synthesis of antibacterial silver chloride nanoparticles using leaf extracts of *Cissus quadrangularis* Linn.** Mat Lett., 2013, 91, 224-227.
61. VILLANUEVA, M. I.; *et al.* **Aqueous cornhusk extract-mediated green synthesis of AgCl and Ag nanoparticles,** Mater. Lett. 152 (2015) 166–169.
62. ABBASI, A.R.; MORSALI, A. **Synthesis and characterization of AgCl nanoparticles under various solvents by ultrasound method,** J. Inorg. Organomet. Polym.Mater. 23 (2013) 286–292.
63. YAN-YU , Ren; *et al.*. **Green synthesis and antimicrobial activity of monodisperse silver nanoparticles synthesized using Ginkgo Biloba leaf extract.** Physics Letters A 380 (2016) 3773–3777.
64. Archana , D.; Singh, Brijesh K.; Dutta , Joydeep ; Dutta , P.K. **Chitosan-PVP-nano silver oxide wound dressing: In vitro and in vivo evaluation.** International Journal of Biological Macromolecules 73 (2015) 49–57
65. PATRA, Jayanta Kumar; BAEK, Kwang-Hyun. **Green synthesis of silver chloride nanoparticles using *Prunus persica* L. outer peel extract and**

- investigation of antibacterial, anticandidal, antioxidant potential.** Green Chemistry Letters and Reviews, 2016
66. CANEVAROLO Jr, S. V. **Ciência dos Polímeros**. Editora Artliber, 2004.
 67. BRUICE, Paula Yurkanis. **Química orgânica**, quarta edição, São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2006.
 68. BARCELOS, Ingrid David. **Estudos de propriedades estruturais e óticas de heteroestruturas formadas por materiais bidimensionais**. Belo Horizonte – MG: Instituto de Ciências Exatas, departamento de Física, Universidade Federal de Minas Gerais, 145 p. , Tese (Doutorado),2015.
 69. CALLISTER, William D. RETHWISCH, D. G. **Ciência e engenharia de materiais: uma introdução**. LTC, 2012.
 70. Imagem disponível em: <www.veqter.co.uk/residual-stress-measurement/x-ray-diffraction> Acesso em 05 de agosto de 2016.
 71. EDINGTON, J. W., **Practical electron microscopy in materials science**. N. V. Philips Gloeilampenfabrieken, Eindhoven (1976).
 72. Imagem disponível em: <fap.if.usp.br/~lff/mev.html> Acesso em 15 de dezembro de 2016.
 73. GOLDSTEIN, J. I.; NEWBURY, D. E.; ECHLIN, P.; JOY, D. C.; FIORI, C.; LIFSHIN, E. **Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis**. Plenum Publishing Corp, EUA, 1984, 673p.
 74. SILVA FILHO, E. A.; CASTRO, E. V. R. ; CASTRO, E. V. R. ; KOCK, F. V. C. ; KOCK, F. V. C. . **Obtenção e Caracterização do Copolímero beta-(1-4)-D-Glucosamina**. 2011, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: PI11064145, data de depósito: 27/09/2011, título: "Obtenção e Caracterização do Copolímero beta-(1-4)-D-Glucosamina" , Instituição de registro:INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Instituição(ões) financiadora(s): LABPETRO-UFES.
 75. LOZA, K.; SENGSTOCK, S.; CHERNOUSOVA,S. ; K'OLLER , M.; EPPLE, M.. **The predominant species of ionic silver in biological media is colloiddally dispersed nanoparticulate silver chloride**. RSC Adv., 2014, 4, 35290
 76. MOURA, Jaqueline M.; *et al.* **Preparation of Chitosan with Different Characteristics and Its Application for Biofilms Production**. J Polym Environ (2015) 23:470–477
 77. NELSON, L.G.D.; *et al.* **Synthesis, Vibratrional Spectroscopic and Thermal Properties of Oxocarbon Cross-Linked Chitosan**. J. Braz. Chem. Soc., Vol. 26, n. 6, 2015, 1247-1256.
 78. OLIVEIRA, S. S. L.; OLIVEIRA, H. M. L. FOOK M. V. L. **Arcabouços obtidos por agregação de esferas de quitosana/hidroxiapatita**. Revista Eletrônica de Materiais e Processos, v. 10, n. 3 (2015) 128–136
 79. RUFF Database. Disponível em < <http://ruff.info/>>. Acesso em 20 de outubro de 2016.
 80. JHA, Prashant K.; HALADA, Gary P.; MCLENNAN, Scott M. **Electrochemical Synthesis of Nitro-Chitosan and Its Performance in**

Chromium Removal. Coatings 2013.

81. EDISON, T.N.J.I.; ATCHUDAN, Raji; SETHURAMAN, Mathur Gopalakrishnan; LEE, Yong Rok. **Reductive-degradation of carcinogenic azo dyes using *Anacardium occidentale* testa derived silver nanoparticles.** Journal of Photochemistry e Photobiology, B: Biology 162 (2016) 604–610.
82. PARVEEN, Mehtab; AHMAD, Faheem; MALLA, Ali Mohammed; AZAZ, Shaista. **Microwave-assisted green synthesis of silver nanoparticles from *Fraxinus excelsior* leaf extract and its antioxidant assay.** Appl Nanosci (2016) 6:267–276
83. RAVICHANDRAN, Veerasamy; VASANTHI, Sethu; SIVADASAN, Shalini; SYED, Adnan Ali Shah; RAJAK, Harish. **Green synthesis of silver nanoparticles using *Atrocarpus altilis* leaf extract and the study of their antimicrobial and antioxidant activity.** Materials Letters 180 (2016) 264–267
84. KIM, Yeon-Ju; FARH, Mohamed; YANG, Deok-Chun. **Biogenic silver and gold nanoparticles synthesized using red ginseng root extract, and their applications.** Informa Healthcare -USA, 2015.
85. GEETHALAKSHMI, R; SARADA, D.V.. **Gold and silver nanoparticles from *Trianthema decandra*: synthesis, characterization, and antimicrobial properties.** Int J Nanomedicine. 7 (2012) : 5375 – 5384.
86. SHEN, J. et al. **Synthesis of AgCl/PMMA hybrid membranes and their sorption performance of cyclohexane/cyclohexene.** Journal of Membrane Science 304 (2007) 118–124
87. SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos.** 7. Ed. Rio de Janeiro: Ltc, p. 508,2007.
88. FERNANDES, Ligia L. et al . **Cytocompatibility of chitosan and collagen-chitosan scaffolds for tissue engineering.** Polímeros, São Carlos, v. 21, n. 1, p. 1-6, 2011 .
89. LIU, X.; MA, P. X. **Polymeric scaffolds for bone tissue engineering.** Annals of biomedical engineering, New York, v.32, n.3, p.477-486, 2004.
90. TAYLOR, E. D.; KHAN, Y.; LAURENCIN, C. T. **Tissue engineering of bone: A primer for the practicing hand surgeon.** The Journal of Hand Surgery, St. LOUIS, v.34, n.1, 2009.